

**LUIS FERNANDO BERNAL DA COSTA SEGURO**

**Comprometimento do metabolismo ósseo em  
pacientes transplantados cardíacos:  
resultados de estudo de coorte prospectivo**

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Bacal

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues  
Pereira

**São Paulo**

**2019**

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Seguro, Luis Fernando Bernal da Costa  
Comprometimento do metabolismo ósseo em pacientes  
transplantados cardíacos : resultados de estudo de  
coorte prospectivo / Luis Fernando Bernal da Costa  
Seguro. -- São Paulo, 2019.  
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Cardiologia.  
Orientador: Fernando Bacal.  
Coorientadora: Rosa Maria Rodrigues Pereira.

Descritores: 1. Transplante de coração  
2. Osteoporose 3. Fraturas da coluna vertebral  
4. Densidade óssea 5. Vitamina D 6. Biomarcadores

USP/FM/DBD-360/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

**Dedicatória**

---

Aos meus pais Francisco e Teresa Cristina, pelo apoio ao longo de toda a minha vida e formação.

A minha querida esposa Luciana, por ter estado sempre ao meu lado. Obrigado pelo carinho, paciência e dedicação.

Aos meus filhos Felipe e Lucas. Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

## **Agradecimentos**

---

Ao o meu orientador, Prof. Dr. Fernando Bacal, por ter sido meu mentor não apenas nesta tese, mas em toda minha carreira na cardiologia.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira, pela dedicação, paciência e enorme conhecimento. Sem sua participação, este projeto certamente não teria acontecido.

À colega e amiga, Fabiana Goulart Marcondes Braga, pela confiança e estímulo para que realizasse este projeto.

Aos demais companheiros de trabalho do Núcleo de Transplantes, Iascara Wosniak de Campos, Monica Samuel Avila e Sandrigo Mangini, pela agradável convivência e amizade nos últimos anos.

A todos os funcionários do Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da FMUSP (LIM-17), em especial a Dra. Valéria de Falco Caparbo, pela paciência e disponibilidade para receber os pacientes e realizar os procedimentos necessários.

Aos professores de minha banca de qualificação, Dr. Diogo Souza Domiciano, Dr. Victor Sarli Issa e Prof. Dr. Felix José Alvarez Ramires, pelas sugestões valiosas que contribuíram para a finalização desta tese.

À Comissão de Pós-Graduação, pela gentileza e auxílio em todas as etapas da tese.

À Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do auxílio à pesquisa e apoio financeiro a este projeto.

À minha família, pelo apoio e estímulo sempre.

E, sobretudo, a todos os pacientes que participaram voluntariamente deste estudo.

**“Não existe caminho para a felicidade.**

**A felicidade é o caminho.”**

Mahatma Gandhi

**Normatização adotada**

---



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

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

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

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

## Sumário

---

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Transplante cardíaco.....	3
1.2	Osteoporose pós-transplante .....	4
1.2.1	Efeito dos glicocorticoides.....	5
1.2.2	Efeito dos inibidores de calcineurina .....	7
1.2.3	Outros fatores .....	8
1.3	Avaliação da densidade e microarquitetura óssea .....	9
1.4	Prevenção e tratamento da osteoporose pós-transplante.....	11
2	OBJETIVO.....	14
2.1	Objetivo Primário.....	15
2.2	Objetivos Secundários .....	15
3	MÉTODOS.....	16
3.1	Desenho do estudo.....	17
3.2	População.....	17
3.2.1	Critérios de inclusão .....	17
3.2.2	Critérios de exclusão .....	18
3.3	Cálculo de amostra .....	18
3.4	Seguimento dos pacientes.....	18
3.5	Protocolo de imunossupressão .....	19
3.6	Dados clínicos e demográficos.....	19
3.7	Avaliação laboratorial.....	20
3.8	Avaliação da densidade mineral óssea .....	21
3.9	Avaliação de fratura vertebral (VFA) .....	22
3.10	Avaliação da microarquitetura óssea.....	23
3.11	Avaliação do nível habitual de atividade física .....	24
3.12	Análise estatística .....	25
4	RESULTADOS.....	27
4.1	Análise laboratorial e de biomarcadores de metabolismo ósseo .....	31
4.2	Análise de atividade física habitual .....	33
4.3	Análise de uso de imunossupressores.....	34
4.4	Análise de densidade mineral óssea e frequência de osteoporose densitométrica.....	35
4.4.1	Variação de massa óssea após o transplante cardíaco .....	36
4.4.2	Avaliação dos fatores associados à osteoporose.....	38

4.4.3	Avaliação dos fatores associados à perda de massa óssea .....	40
4.5	Análise da microarquitetura óssea .....	42
4.6	Análise de fraturas .....	45
5	DISCUSSÃO.....	49
6	CONCLUSÕES.....	57
7	ANEXOS.....	59
8	REFERÊNCIAS.....	73

**Listas**

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>CAPPesq</b>	Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
<b>CTX</b>	Telopectideo carboxi-terminal do colágeno tipo I
<b>DMO</b>	Densidade mineral óssea
<b>DXA</b>	Absortimetria por dupla emissão de raios-X
<b>FAPESP</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>FMUSP</b>	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>HR-pQCT</b>	Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução
<b>IC (95%)</b>	Intervalo de confiança de 95%
<b>IMC</b>	Índice de massa corpórea
<b>ISCD</b>	<i>International Society for Clinical Densitometry</i>
<b>MVS</b>	Mínima variação significativa
<b>OR</b>	<i>Odds Ratio</i>
<b>P1NP</b>	Propeptideo amino-terminal do pro-colágeno tipo I
<b>PTH</b>	Paratormônio
<b>SOST</b>	Esclerostina
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>UTI</b>	Unidade de terapia intensiva
<b>VFA</b>	<i>Vertebral fracture assessment</i>
<b>25OHD</b>	25-hidroxivitamina D

### Parâmetros da HR-pQCT

<b>BV/TV</b>	Volume ósseo trabecular
<b>Ct.Th</b>	Densidade volumétrica óssea cortical
<b>Ct.vBMD</b>	Densidade volumétrica óssea cortical
<b>Tb.N</b>	Número trabecular
<b>Tb.Sp</b>	Separação trabecular
<b>Tb.Th</b>	Espessura trabecular
<b>Tb.vBMD</b>	Densidade volumétrica óssea trabecular

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Fluxo dos pacientes durante o estudo .....	5
<b>Figura 2 -</b>	Varição percentual média da DMO durante o seguimento de 12 meses .....	22
<b>Figura 3 -</b>	Varição de massa óssea entre a avaliação inicial e 6 meses ( $\Delta T0$ a $T6$ ) e entre 6 e 12 meses ( $\Delta T6$ a $T12$ ) .....	32
<b>Figura 4 -</b>	Variações percentuais das médias de diferenças dos parâmetros da HR-pQCT .....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Características clínicas da população .....	3
<b>Tabela 2 -</b>	Comparação dos resultados dos exames laboratoriais e biomarcadores de metabolismo ósseo entre avaliação inicial (T0), 6 meses (T6) e 12 meses (T12). ....	10
<b>Tabela 3 -</b>	Comparação da atividade física entre avaliação inicial (T0), 6 meses (T6) e 12 meses (T12). ....	23
<b>Tabela 4 -</b>	Imunossupressão utilizada na avaliação inicial (T0), 6 meses (T6) e 12 meses (T12). ....	27
<b>Tabela 5 -</b>	Densidade mineral óssea pela DXA e frequência de osteoporose densitométrica na avaliação inicial (T0), 6 meses (T6) e 12 meses (T12). ....	33
<b>Tabela 6 -</b>	Osteoporose na avaliação inicial (T0). ....	34
<b>Tabela 7 -</b>	Perda significativa de massa óssea entre T0 e T6 .....	37
<b>Tabela 8 -</b>	Análise multivariada de variáveis associadas a perda significativa de massa óssea entre a avaliação inicial (T0) e 6 meses (T6). ....	40
<b>Tabela 9 -</b>	Parâmetros da HR-pQCT na avaliação inicial (T0) e as médias das variações individuais dos parâmetros entre o início e 6 meses ( $\Delta T6-T0$ ) e entre 6 e 12 meses ( $\Delta T12-T6$ ). ....	40
<b>Tabela 10 -</b>	Pacientes com fratura vertebral na avaliação inicial (T0), 6 meses (T6) e 12 meses (T12) .....	41
<b>Tabela 11 -</b>	Fratura vertebral pela DXA na avaliação inicial (T-0). ....	41
<b>Tabela 12 -</b>	Análise multivariada de variáveis associadas a fratura em T0 .....	42



**Resumo**

---

***Seguro LFBC. Comprometimento do metabolismo ósseo em pacientes transplantados cardíacos: resultados de estudo de coorte prospectivo***

[Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

**Introdução:** Dados na prevenção de fraturas após transplante cardíaco são controversos na literatura. Há questionamentos a respeito da segurança e eficácia dos bisfosfonatos nesta população. Um melhor conhecimento dos efeitos do transplante cardíaco no osso pode orientar o tratamento adequado. O objetivo do estudo foi avaliar metabolismo ósseo, densidade mineral óssea (DMO), microarquitetura e a frequência de fraturas vertebrais após transplante cardíaco. **Métodos:** Setenta adultos submetidos a transplante cardíaco foram seguidos prospectivamente por 12 meses. Dados clínicos, laboratoriais, DMO, microarquitetura (por HR-pQCT) e fraturas vertebrais foram avaliados no momento inicial (após alta da UTI), após 6 e 12 meses. DMO, composição corporal e fraturas vertebrais foram avaliadas pela densitometria. Todos os pacientes receberam orientações dietéticas para ingestão adequada de cálcio e suplementação oral de vitamina D após o transplante (50.000UI/semana por 3 meses, seguido de 7.000UI/semana). **Resultados:** Na avaliação inicial, 27% dos pacientes tinham osteoporose, associada ao tempo de hospitalização antes do transplante ( $p=0,001$ ). A DMO reduziu nos primeiros 6 meses, com recuperação parcial após. Houve deterioração de microarquitetura óssea, principalmente de osso trabecular nos primeiros 6 meses e osso cortical nos 6 meses subsequentes. Na avaliação inicial, 92,9% dos pacientes tinham vitamina D  $<30$  ng/mL e 20,0%

<10ng/mL. Pacientes também apresentavam cálcio sérico no limite inferior da normalidade, fosfatase alcalina elevada e marcador de reabsorção óssea elevado. Estas alterações eram sugestivas de defeito de mineralização óssea e normalizaram em 6 meses com a correção da deficiência de cálcio e de vitamina D. A maioria das fraturas vertebrais foi identificada já na avaliação inicial (23% dos pacientes). Após análise multivariada, apenas massa gorda reduzida permaneceu como fator de risco para fratura vertebral ( $p=0,012$ ). **Conclusão:** Altas frequências de osteoporose densitométrica, deficiência de vitamina D, anormalidades de marcadores ósseos e fraturas vertebrais foram observadas logo após o transplante cardíaco. A correção da deficiência de cálcio e de vitamina D deveria ser o primeiro passo para a correção do defeito de mineralização óssea, antes de outras terapias específicas para osteoporose serem iniciadas. Atenção especial deve ser dada aos pacientes com hospitalização prolongada antes do transplante e com baixa massa gorda.

**Descritores:** Transplante de coração; Osteoporose; Fraturas de coluna vertebral; Densidade óssea; Vitamina D; Biomarcadores.

## **Abstract**

---

**Seguro LFBC. Bone metabolism impairment in heart transplant: results from a prospective cohort study** [thesis]. Sao Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

**Background:** Data on the prevention of fractures after heart transplant are controversial in the literature. There are doubts about the safety and efficacy of the use of bisphosphonates in this population. Understanding the effects of heart transplant on bone may guide appropriate treatment. The aim of the study was to evaluate bone metabolism, bone mineral density (BMD), microarchitecture and frequency of vertebral fractures after heart transplant.

**Methods:** Seventy adult heart transplant patients were prospectively followed for 12 months. Clinical and laboratory parameters, BMD, microarchitecture (by HR-pQCT) and vertebral fractures were assessed at baseline (after intensive care unit discharge) and at 6 and 12 months. BMD, body composition and vertebral fractures were evaluated by DXA. Patients received recommendations regarding calcium intake and vitamin D supplementation after heart transplant (50,000IU/week for 3 months followed by 7,000IU/week). **Results:** At baseline, 27% of patients had osteoporosis, associated with the length of hospitalization before transplant ( $p=0.001$ ). BMD decreased in the first 6 months, with partial recovery later. Bone microarchitecture deteriorated, mainly in the trabecular bone in the first 6 months and cortical bone in the subsequent 6 months. At baseline, 92.9% of patients had vitamin D levels  $<30$  ng/mL and 20.0%  $<10$  ng/mL. Patients also

had calcium at the lower limit of normal, high alkaline phosphatase, and high bone resorption biomarker. These abnormalities were suggestive of impaired bone mineralization and normalized at 6 months with correction of calcium and vitamin D deficiency. The majority of vertebral fractures were identified at baseline (23% of patients). After multivariate analyses, only a lower fat mass persisted as a risk factor for vertebral fractures ( $p=0.012$ ). **Conclusions:** High frequencies of densitometric osteoporosis, vitamin D deficiency, bone markers abnormalities and vertebral fractures were observed shortly after heart transplant. Correction of calcium and vitamin D deficiency should be the first step in correcting bone mineralization impairment before specific osteoporosis treatment. Special attention should be given to patients with a long hospitalization duration before heart transplant and a low fat mass.

**Descriptors:** Heart transplantation; Osteoporosis; Spinal fractures; Bone density; Vitamin D; Biomarkers.

# 1 Introdução

---

## 1. INTRODUÇÃO

O transplante cardíaco é reconhecido como o melhor tratamento para insuficiência cardíaca refratária. Com a melhora da sobrevida dos pacientes transplantados, observou-se aumento da incidência de comorbidades relacionadas ao procedimento, como a osteoporose e sua principal complicação, as fraturas por fragilidade. Na população geral, as fraturas por fragilidade óssea estão associadas a aumento da mortalidade geral e cardiovascular e o tratamento da osteoporose proporciona aumento de sobrevida.<sup>1-5</sup> Apesar de não haver dados em relação a aumento de risco de mortalidade relacionado a fraturas em pacientes transplantados, fraturas por fragilidade podem ter impacto no retorno às atividades plenas.

O tratamento da osteoporose pós-transplante cardíaco é controverso. Apesar de estudos prévios terem demonstrado que bisfosfonatos podem prevenir perda de massa óssea, não mostraram resultados consistentes na prevenção de fraturas.<sup>6-13</sup> Além disso, o uso de alguns bisfosfonatos em outras populações foi associado a eventos adversos cardíacos, como hospitalização por fibrilação atrial.<sup>14,15</sup>

Dessa forma, um melhor conhecimento do efeito do transplante cardíaco em parâmetros de metabolismo ósseo, na massa óssea e na microarquitetura óssea, assim como o reconhecimento dos pacientes de maior risco de fratura, podem auxiliar na identificação de pacientes que devam se beneficiar de tratamentos mais agressivos para osteoporose.



O objetivo do estudo foi avaliar metabolismo ósseo, densidade mineral óssea, microarquitetura óssea e a frequência de fraturas vertebrais no primeiro ano após o transplante cardíaco.

O trabalho foi uma parceria entre o Núcleo de Transplantes do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e o Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da FMUSP (LIM-17).

### 1.1. Transplante cardíaco

A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica complexa que decorre de anormalidades da estrutura e/ou função cardíaca que prejudicam a habilidade do ventrículo de se encher ou bombear o sangue. A insuficiência cardíaca é a via final das principais doenças cardiovasculares, sendo uma patologia de caráter progressivo. O envelhecimento da população e a queda da mortalidade por outras doenças cardiovasculares que levam à insuficiência cardíaca têm resultado no aumento da incidência desta afecção. Além disso, os pacientes com insuficiência cardíaca têm apresentado melhor sobrevida, graças à melhora do tratamento nas últimas décadas. Desta forma, temos observado um aumento progressivo na prevalência da insuficiência cardíaca no Brasil e no mundo, sendo hoje uma das principais causas de internação hospitalar e a principal causa de morte cardiovascular.<sup>16</sup>

O transplante cardíaco é reconhecido como o melhor tratamento para a insuficiência cardíaca refratária. Proporciona um significativo aumento na sobrevida, na capacidade de exercício, no retorno ao trabalho e na qualidade de vida.<sup>17</sup> Seu sucesso depende sobretudo do uso de drogas imunossupressoras.

Com o aumento da sobrevida após o transplante, complicações decorrentes do procedimento, da doença de base e, sobretudo, da terapia imunossupressora passam a ser reconhecidas. Destas, podemos destacar: infecções, neoplasias, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, diabetes melito, insuficiência renal, osteoporose e fraturas por fragilidade.<sup>18</sup>

## 1.2. Osteoporose pós-transplante

A osteoporose é uma doença sistêmica do esqueleto caracterizada pela perda de massa óssea e deterioração na microarquitetura do tecido ósseo, resultando em fragilidade do osso e suscetibilidade a fraturas.<sup>19,20</sup> A baixa densidade e perda óssea recente têm sido associadas a maior taxa de mortalidade geral e cardiovascular, independentemente da idade. Além disso, estudos demonstram aumento de mortalidade após a ocorrência de fratura vertebral ou quadril, a qual é reduzida com o tratamento da osteoporose.<sup>1-5</sup>

Muitos fatores contribuem para patogênese da osteoporose após o transplante cardíaco. Primeiramente, devemos destacar a alta prevalência da doença óssea antes mesmo do procedimento. Aproximadamente 8 a 23%

de pacientes com insuficiência cardíaca terminal, em fila para transplante cardíaco, apresentam osteoporose.<sup>21,22</sup> A presença de algum grau de insuficiência renal, deficiência de vitamina D, hiperparatireoidismo secundário, hipogonadismo, uso de medicações (como diuréticos) e a redução da intensidade de atividade física são os responsáveis pela perda óssea no paciente com insuficiência cardíaca avançada.<sup>23</sup>

Após o transplante, a perda óssea se acentua. Estudos demonstram perda de 2 a 10% de massa óssea na coluna lombar e 6 a 11% no colo do fêmur no primeiro ano.<sup>23,24</sup> Isto resulta em aumento de fraturas por fragilidade, que chegam a ser identificadas em até 40% dos pacientes transplantados,<sup>25</sup> sendo que a maior parte ocorre já no primeiro ano após o transplante. Um estudo prospectivo com 108 pacientes transplantados cardíacos identificou fraturas vertebrais em 21% dos pacientes após um ano do transplante.<sup>26</sup> A principal causa para este aumento da perda óssea é a terapia imunossupressora, em especial o uso de glicocorticoides.<sup>27</sup>

### 1.2.1. Efeito dos glicocorticoides

Os glicocorticoides são utilizados em todos os protocolos de imunossupressão após o transplante cardíaco. Exercem potente efeito imunossupressor e anti-inflamatório, atuando na regulação de genes que afetam a função de leucócitos, citocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento. Inicialmente são utilizados em doses maiores, com subsequente redução da dose ao longo do tempo. Durante episódios de

rejeição, as doses são aumentadas transitoriamente, sendo que muitas vezes altas doses de glicocorticoide endovenoso são administradas. Devido aos seus inúmeros efeitos colaterais, sua retirada tem sido preconizada a partir do sexto mês após o transplante, principalmente nos pacientes com histórico favorável de rejeições.<sup>17,18,28,29</sup>

Os efeitos dos glicocorticoides no esqueleto são múltiplos. Inicialmente aumentam a reabsorção óssea por estimular fatores de crescimento e desenvolvimento dos osteoclastos, estimulando a osteoclastogênese e inibindo a apoptose de osteoclastos. Este efeito é transitório e seguido de inibição persistente da formação óssea pela redução da replicação, diferenciação e tempo de vida dos osteoblastos. Reduzem a osteoblastogênese por inibição da via de sinalização Wnt e aumento da expressão do receptor PPAR $\gamma$ 2 (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2*), e estimulam a apoptose de osteoblastos e osteócitos por meio da ativação da caspase 3. Adicionalmente, os glicocorticoides inibem a produção de colágeno tipo I, osteocalcina, fatores de crescimento e outras proteínas da matriz óssea.<sup>30</sup>

Outros efeitos indiretos dos glicocorticoides também contribuem para perda óssea. A redução da absorção intestinal de cálcio e a perda de cálcio pelos rins que podem induzir a hiperparatireoidismo secundário. A inibição da produção de hormônios gonadais que leva a aumento da reabsorção óssea. Além disso, a fraqueza muscular que pode ser induzida pelos glicocorticoides, pode atrasar a mobilização no pós-transplante, agravando a perda óssea.<sup>31</sup>

A perda óssea induzida pelo uso de glicocorticoide aparece rapidamente após o início da terapia, sendo maior nos primeiros três meses. O risco de desenvolver osteoporose induzida por glicocorticoide é maior em pacientes com baixo índice de massa corpórea, com baixa densidade mineral óssea, com maior idade, na pós-menopausa, em tabagistas e etilistas. O risco está relacionado com a dose de glicocorticoide utilizada. É importante ressaltar que as fraturas na osteoporose induzida por glicocorticoide acontecem com valores de densidade mineral óssea maior que na osteoporose pós-menopausa ou senil. Diretrizes foram elaboradas para prevenção e tratamento da osteoporose induzida por glicocorticoide em populações de maior risco.<sup>32-34</sup>

### 1.2.2. Efeito dos inibidores de calcineurina

A introdução da ciclosporina na terapia imunossupressora pós-transplante cardíaco na década de 80 refletiu em importante redução de rejeição, melhorando a sobrevida dos pacientes transplantados. Os inibidores de calcineurina (ciclosporina e tacrolimus) se ligam a proteínas intracelulares específicas (imunofilinas), formando complexos. Estes inibem a ação da enzima calcineurina, a qual em condições normais induz a síntese de interleucina-2 e outras citocinas pelo linfócito T.<sup>35</sup>

Os inibidores de calcineurina podem causar perda óssea através de efeito direto em osteoclastos ou indiretamente através de alteração da função da célula T.<sup>31</sup> Em modelos experimentais, os inibidores de

calcineurina provocam aumento na formação e, principalmente, na reabsorção óssea, levando a significativa perda óssea trabecular. No entanto, estudos que avaliaram seu efeito no esqueleto humano mostraram resultados conflitantes.<sup>36-38</sup> O fato de os inibidores de calcineurina serem usualmente utilizados concomitantes a glicocorticoides dificulta a avaliação do seu efeito no esqueleto humano. Dessa forma, estudos populacionais não conseguiram estabelecer associação entre esta classe de imunossuppressores e o risco de perda de massa óssea ou fratura.<sup>39</sup>

### 1.2.3. Outros fatores

Outros fatores que também podem influenciar no metabolismo ósseo no paciente transplantado são a baixa atividade física, principalmente nos primeiros meses após o procedimento, e a deficiência de vitamina D.

A prevalência de insuficiência de vitamina D (25-OH-vitamina D <30 ng/mL) é alta na população de pacientes transplantados (50–97%), sendo que até 30% dos pacientes apresentam deficiência grave (25-OH-vitamina D <10 ng/mL). Pode ser causada por redução à exposição solar (limitada pelo risco aumentado de desenvolver câncer de pele) e efeito de glicocorticoides (que aumentam o catabolismo da 25-OH-vitamina D).<sup>40,41</sup>

Os efeitos esqueléticos da deficiência de vitamina D incluem: osteomalácia, hiperparatireoidismo secundário, perda óssea e fraturas. Além disso, a vitamina D tem propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatória, sendo que sua deficiência está relacionada a maior mortalidade no paciente

transplantado cardíaco.<sup>42</sup> Estudos experimentais em animais demonstram redução de rejeição e melhora de sobrevida com a administração de calcitriol (1,25 OH-vitamina D).<sup>41</sup>

### 1.3. Avaliação da densidade e microarquitetura óssea

O uso da absorptiometria por dupla emissão de raios-X (DXA) para inferir a densidade mineral óssea (DMO) tem sido o método de escolha para avaliação clínica da baixa massa óssea e risco de fraturas, pois é um método preciso, rápido e de baixa radiação. Entretanto, as medições da DMO por DXA são bidimensionais e não se consegue avaliar separadamente as contribuições dos ossos trabecular e cortical ou ter acesso a microarquitetura óssea. Dessa maneira, a avaliação tridimensional e avaliação da densidade mineral óssea volumétrica podem ser úteis e novas tecnologias foram desenvolvidas para avaliar alterações da qualidade óssea que influenciam na resistência óssea.

A tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução (HR-pQCT – *High Resolution peripheral Quantitative Computed Tomography*) permite o acesso *in vivo* da estrutura óssea trabecular e cortical e da densidade mineral óssea volumétrica (vDMO; mg hidroxiapatita/cm<sup>3</sup> [mg HA/cm<sup>3</sup>]). HR-pQCT tem um voxel isotrópico de 82 µm, que permite um acesso direto a densidade volumétrica óssea total (*D100*), densidade volumétrica óssea trabecular (*Tb.vBMD*), número trabecular (*Tb.N*), densidade volumétrica óssea cortical (*Ct.vBMD*) e

espessura cortical (*Ct.Th*). HR-pQCT indiretamente avalia o volume ósseo trabecular (*BV/TV*), espessura trabecular (*Tb.Th*) e separação trabecular (*Tb.Sp*).<sup>43</sup> A caracterização da estrutura óssea e geométrica dos compartimentos do osso trabecular e cortical oferece uma importante visão dos elementos que sustentam a resistência óssea durante o crescimento.<sup>44</sup> Modelos de análise de elemento finito permitem, a partir de dados adquiridos pela HR-pQCT, analisar propriedades biomecânicas, como rigidez (*stiffness*), máxima carga suportada (*failure load*) e elasticidade do tecido ósseo (*apparent modulus*).<sup>45</sup>

A medida da DMO por DXA não reflete totalmente as alterações da microarquitetura óssea que podem afetar a resistência óssea. Em estudo multicêntrico de intervenção para avaliação de fraturas, a eficácia das drogas testadas era apenas parcialmente explicada com base nos efeitos na DMO.<sup>46,47</sup> Neste contexto, e especificamente na osteoporose, surge o conceito de qualidade óssea.<sup>48</sup>

Estudo com o uso de ressonância magnética de alta resolução para avaliação de estrutura óssea em pacientes transplantados cardíacos demonstrou melhor acurácia na predição de fraturas do que a DMO.<sup>49</sup>

Não há estudos avaliando a microarquitetura óssea através da HR-pQCT em pacientes transplantados. Além disso, existem poucos dados em relação à avaliação óssea em pacientes transplantados cardíacos no Brasil.<sup>50</sup>



#### 1.4. Prevenção e tratamento da osteoporose pós-transplante

O principal objetivo da prevenção e tratamento da osteoporose pós-transplante é a diminuição do risco de fraturas. As drogas que foram mais estudadas no tratamento dos distúrbios ósseos nestes pacientes são os bisfosfonatos e a vitamina D.

Apesar de alguns estudos descreverem efeitos benéficos dos bisfosfonatos na densidade óssea de receptores de transplante cardíaco, os resultados em relação à prevenção de fraturas não são consistentes. Dois estudos mostraram efeito benéfico do ibandronato (2 vs. 17 fraturas,  $p=0,04$ )<sup>10</sup> e do pamidronato seguido de etidronato e calcitriol (3 vs. 30 fraturas vertebrais e 0 vs. 4 fraturas não-vertebrais,  $p<0,02$ )<sup>6</sup> comparado com controle. No entanto, outros não mostraram resultados favoráveis na prevenção de fraturas.<sup>7-9,11-13,18</sup>

Além disso, alguns estudos alertam para eventos adversos cardíacos associados ao uso de bisfosfonatos orais e endovenosos.<sup>14,15,51,52</sup> Uma meta-análise evidenciou aumento da incidência de fibrilação atrial com necessidade de internação relacionada ao uso de bisfosfonatos.<sup>51</sup>

A segurança de outras drogas utilizadas no tratamento da osteoporose em pacientes transplantados cardíacos também precisa ser considerada antes do seu uso nesta população. Um estudo que descreveu a experiência do uso de denosumabe em dez pacientes submetidos a transplante de coração ou pulmão alertou para o risco de evento adverso.

Cinco pacientes apresentaram hipocalcemia, sendo que três tiveram hipocalcemia grave.<sup>53</sup>

Com relação à vitamina D, alguns estudos mostram efeitos benéficos na prevenção de perda de massa óssea após transplante cardíaco com o uso de calcidiol e calcitriol.<sup>9,41,54</sup> Um estudo randomizado mostrou que tanto alendronato como calcitriol iniciados após o transplante cardíaco protegeram de perda de massa óssea em 1 ano.<sup>9</sup>

Outro estudo que avaliou 48 transplantados cardíacos que receberam carbonato de cálcio com calcidiol ou etidronato, mostrou que no grupo calcidiol houve redução de 30-60% de perda de massa óssea (tanto em coluna lombar quanto em fêmur total) e menos fraturas vertebrais comparado ao grupo etidronato (2 vs. 8 novas fraturas vertebrais, em 2 anos).<sup>55</sup> A falta de resposta com o uso de etidronato pode ser explicada pela deficiência de vitamina D, presente nos dois grupos na avaliação basal.

Além disso, os efeitos imunológicos da vitamina D poderiam beneficiar os pacientes transplantados cardíacos. A vitamina D regula a proliferação, diferenciação e resposta de células do sistema imunológico,<sup>56</sup> está associada a diminuição da incidência de infecções<sup>57</sup> e pode ter ação na prevenção da rejeição de transplantes. 1,25-dihidroxitamina D preveniu rejeição de transplante cardíaco em um estudo animal.<sup>58</sup> Também possibilitou redução da dose de ciclosporina em um estudo com pacientes transplantados cardíacos,<sup>59</sup> o que não foi confirmado em outro estudo.<sup>9</sup>

Dada a incerteza do benefício na prevenção de fraturas e o potencial risco de eventos adversos cardíacos, mais estudos são necessários para

definir as indicações apropriadas para uso de drogas na prevenção e tratamento de osteoporose após o transplante cardíaco.

## **2 Objetivo**

---

## 2. OBJETIVO

O objetivo do estudo foi avaliar metabolismo ósseo, densidade mineral óssea, microarquitetura óssea e a frequência de fraturas vertebrais no primeiro ano após o transplante cardíaco.

### 2.1. Objetivo Primário:

- Avaliação da perda de massa óssea em coluna lombar no período de um ano após o transplante cardíaco.

### 2.2. Objetivos Secundários:

- Avaliação da variação da DMO (coluna lombar e fêmur) por DXA em seis meses e um ano após transplante cardíaco;
- Avaliação das alterações na microarquitetura óssea por HRpQCT em seis meses e um ano após transplante cardíaco;
- Avaliação da frequência de fraturas vertebrais após o transplante cardíaco (logo após o transplante, em seis meses e em um ano após);
- Avaliação dos fatores associados a osteoporose, perda de massa óssea e fraturas vertebrais após o transplante cardíaco.

## **3 Métodos**

---

### 3. MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o título "Avaliação da densidade óssea e microarquitetura óssea em pacientes transplantados cardíacos" (CAAE 30896414.0.0000.0068). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O estudo também foi aprovado pela comissão Científica e Coordenação de Pós-Graduação em Cardiologia (SDC 4055/14/035) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2014/21239-4).

#### 3.1. Desenho do estudo

Estudo prospectivo observacional.

#### 3.2. População

##### 3.2.1. Critérios de inclusão:

- pacientes adultos (idade maior que 18 anos) submetidos a transplante cardíaco no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FMUSP e que receberam alta da unidade de terapia intensiva (UTI);
- capacidade de realizar a primeira avaliação em até 60 dias do transplante;

- leitura, aceitação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

#### 3.2.2. Critérios de exclusão:

- transplante de múltiplos órgãos;
- retransplante.

### 3.3. Cálculo de amostra

Para o cálculo amostral, utilizamos o resultado de estudo publicado por Shane et al<sup>12</sup> em 2012, no qual foi observada uma perda de massa óssea na coluna lombar em pacientes transplantados cardíacos que fizeram reposição de vitamina D de 2,6% em um ano, com variabilidade (desvio padrão) de 4,64%. Supondo encontrar resultado similar nos pacientes do estudo atual, com poder de 80% e confiança de 95%, seria necessária a inclusão de 50 pacientes no estudo.

### 3.4. Seguimento dos pacientes

Os pacientes foram acompanhados prospectivamente por um ano e foram avaliados no início do estudo, após a alta da UTI (T0), e após 6 (T6) e 12 (T12) meses. Todos os pacientes receberam orientação dietética para manter aporte adequado de cálcio (1.000 mg/dia) e foram suplementados



com vitamina D (50.000 UI/semana por 3 meses, seguido de 7.000 UI/semana) após o transplante.

### 3.5. Protocolo de imunossupressão

Todos os pacientes receberam metilprednisolona endovenosa no intra-operatório e até o quinto dia após o transplante, seguido de prednisona oral 1mg/kg/dia, com redução progressiva até 5 mg em 3 meses. Episódios de rejeição foram tratados com pulso de metilprednisolona endovenoso. Os pacientes foram tratados inicialmente com ciclosporina, sendo feito troca por tacrolimus após rejeição aguda. Pacientes com doença de Chagas foram inicialmente tratados com azatioprina, todos os outros foram tratados com micofenolato sódico.<sup>17</sup>

### 3.6. Dados clínicos e demográficos

Dados demográficos e antropométricos dos pacientes foram coletados por meio de entrevista clínica, questionários autorreportados, revisão de dados em prontuário e exame físico na entrada do estudo (T0), 6 meses (T6) e 12 meses (T12) após o transplante. A avaliação inicial (T0) foi feita com o paciente clinicamente estável, após a fase crítica de tratamento intensivo pós-transplante, próximo à data da alta hospitalar, no máximo 60 dias após o transplante. Os seguintes dados foram registrados: idade, peso, altura, índice de massa corpórea (IMC), comorbidades, medicações em uso,

dose e tempo de uso de glicocorticoides e outros imunossupressores, história de fraturas, data e dados do transplante, etiologia da miocardiopatia e tempo de doença até o transplante.

### 3.7. Avaliação laboratorial

Foram analisados exames laboratoriais colhidos de rotina no seguimento de pacientes transplantados cardíacos, incluindo: ureia, creatinina, sódio, potássio, cálcio, cálcio iônico, fósforo, albumina e fosfatase alcalina.

No dia da realização dos exames de imagem (DXA e HR-pQCT), nos tempos 0, 6 e 12, uma amostra de sangue dos pacientes foi coletada e armazenada sob refrigeração a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. Foram dosados os marcadores de metabolismo ósseo: propeptideo amino-terminal do procolágeno tipo I (P1NP), telopeptideo carboxi-terminal do colágeno tipo I (CTX), 25-hidroxivitamina D (25OHD), paratormônio (PTH) e esclerostina (SOST).

O P1NP (marcador de formação óssea), CTX (marcador de reabsorção óssea), PTH e 25OHD foram dosados no soro por eletroquimioluminescência (*Elecsys systems E411, Roche Diagnostics®, Mannheim, Germany*).<sup>60</sup> Os coeficientes de variação obtidos foram: 2,2% (P1NP), 2,5% (CTX), 2,3-5,1% (PTH) e 1,6-6,6% (25OHD). Os valores séricos de SOST foram medidos usando ensaio imuno-enzimático (*ELISA-*

*SCLEROSTIN*, Biomedica, Viena, *Austria*).<sup>61</sup> Os coeficientes de variação intra- e interensaios foram de 5 e 6% respectivamente.

Os ensaios de P1NP, CTX, PTH, 25OHD e SOST foram realizados de acordo com as recomendações dos fabricantes, no Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da FMUSP (LIM-17).

### 3.8. Avaliação da densidade mineral óssea

A DMO foi medida nos tempos 0, 6 e 12 por DXA usando equipamento de densitometria (*Hologic QDR 4500, Bedford, MA, EUA*). Foram feitas medidas de DMO em coluna lombar (L1 a L4), colo de fêmur e fêmur total bilateral. As avaliações foram feitas por um mesmo técnico com experiência no método, no Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da FMUSP (LIM-17), conforme recomendações da *International Society for Clinical Densitometry (ISCD)*.<sup>62</sup>

Nas análises de DMO também foram calculados o T-score (comparação com adultos jovens do mesmo sexo) e osteoporose foi definida como T-score  $\leq$  -2,5 desvios-padrão. Utilizando esta definição para osteoporose, foi calculada a frequência de osteoporose densitométrica em cada sítio na avaliação inicial, tempo 6 e tempo 12. Calculamos também a frequência de presença de osteoporose densitométrica em qualquer sítio nestes tempos.

A ISCD recomenda o uso da mínima variação significativa (MVS) para a avaliação da perda óssea em ensaios clínicos e na prática clínica. A MVS

representa a menor diferença entre medidas sucessivas de DMO que pode ser considerada uma verdadeira variação em vez de apenas uma flutuação aleatória relacionada à variabilidade do procedimento devido a múltiplas causas incluindo erros do instrumento, variabilidade relacionada aos técnicos operadores e movimentação do paciente.<sup>63,64</sup> Os valores de MVS calculados no Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da FMUSP (LIM-17) e utilizados nas análises são: 0,033 g/cm<sup>2</sup> para coluna lombar e 0,039 g/cm<sup>2</sup> para fêmur total.

A perda de massa óssea individual foi medida utilizando a MVS. Para cada sítio avaliado, diferenças nos valores absolutos da DMO acima da MVS foram consideradas como variação significativa.

A avaliação da composição corporal (massa magra, massa gorda e porcentagem de gordura) foi determinada pela análise de corpo inteiro no mesmo equipamento de densitometria (*Hologic QDR 4500, Bedford, MA, EUA*) nos tempos 0, 6 e 12.

### 3.9. Avaliação de fratura vertebral (VFA)

Imagens da coluna torácica e lombar foram obtidas por DXA nos tempos 0, 6 e 12, usando o mesmo equipamento de densitometria (*Hologic QDR 4500, Bedford, MA, EUA*). As fraturas vertebrais foram identificadas por dois reumatologistas experientes no método (LPCS, RMRP) utilizando o método visual semiquantitativo de Genant, no qual fratura leve (grau 1) é uma redução de 20–25% na altura vertebral (anterior, média e/ou posterior),

moderada (grau 2) uma redução de 26–40% e grave (grau 3) uma redução de mais de 40%.<sup>65,66</sup>

### 3.10. Avaliação da microarquitetura óssea

As avaliações de DMO volumétrica, microarquitetura óssea e propriedades biomecânicas foram realizadas nos tempos 0, 6 e 12 através do equipamento de HRpQCT (Xtreme CT Scanco Medical AG, Brüttisellen, Suíça) na tíbia distal não dominante. As avaliações foram feitas no Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da FMUSP (LIM-17) pelo mesmo técnico com experiência no método, de acordo com as recomendações do fabricante.<sup>67,68</sup>

O volume de interesse total foi automaticamente separado em regiões cortical e trabecular e as seguintes variáveis foram utilizadas nas análises:

#### 1. Parâmetros trabeculares:

- densidade volumétrica óssea trabecular (*Tb.vBMD*);
- volume ósseo trabecular (*BV/TV*);
- número trabecular (*Tb.N*);
- espessura trabecular (*Tb.Th*);
- separação trabecular (*Tb.Sp*);

#### 2. Parâmetros corticais:

- densidade volumétrica óssea cortical (*Ct.vBMD*);
- espessura cortical (*Ct.Th*).

Propriedades biomecânicas foram analisadas para estimar a resistência do osso utilizando modelos de análise de elemento finito obtidos diretamente das imagens da HRpQCT utilizando *software* oferecido pelo fabricante (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Suíça).<sup>68,69</sup> Os seguintes parâmetros foram analisados:

- *stiffness* (rigidez do tecido ósseo);
- *failure load* (estimativa de máxima carga suportada);
- *apparent modulus* (indica a elasticidade do tecido ósseo).

### 3.11. Avaliação do nível habitual de atividade física

O nível habitual de atividade física foi medido nos tempos 0, 6 e 12 com o uso de um acelerômetro triaxial. Foi utilizado o monitor de atividades Dynaport (McRoberts, Holanda), cuja acurácia foi validada em estudo prévio incluindo indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica.<sup>70</sup>

Em cada avaliação, os pacientes foram monitorizados com o acelerômetro durante dois dias, que é o tempo mínimo com uma correlação de confiabilidade intraclasse aceitável demonstrado previamente.<sup>71</sup> Neste período, os pacientes foram orientados a manter suas atividades habituais, só retirando o aparelho durante atividades aquáticas. As seguintes variáveis quantitativas foram analisadas:

- gasto energético em atividade em 24 horas, expresso em Kcal;
- tempo sedentário (deitado ou sentado) em 24 horas, expresso em porcentagem;

- número de passos em 24 horas;

Foi feita uma análise qualitativa de atividade física com o número de passos em 24 horas, utilizando 5.000 passos por dia como ponto de corte para definir o paciente como sedentário.<sup>72</sup>

### 3.12. Análise Estatística

Os dados obtidos foram compilados em banco de dados com uso do *software* Microsoft-Excel 2003, as análises estatísticas foram realizadas com uso do *software* IBM-SPSS for Windows versão 20.0 e os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

Variáveis categóricas foram descritas como frequências e as variáveis contínuas foram descritas como médias e desvios padrão ou medianas e intervalos interquartis. As variáveis categóricas foram comparadas utilizando os testes qui-quadrado, exato de *Fisher* ou razão de verossimilhanças, sendo os dois últimos aplicados quando a amostra foi insuficiente para aplicação do teste qui-quadrado. As variáveis contínuas foram comparadas utilizando os testes *t-Student* ou *Mann-Whitney*.

Regressão logística foi utilizada para identificar variáveis associadas com osteoporose, perda de massa óssea e fraturas vertebrais. Variáveis com  $p < 0,1$  na análise univariada e que apresentaram relevância clínica com relação aos desfechos foram incluídos em um modelo de análise multivariada usando método *backward stepwise*.

Comparações de dados entre os momentos de avaliação (tempos 0, 6 e 12) foram realizados com uso de equações de estimação generalizadas com distribuição normal e função de ligação identidade, supondo matriz de correlações autorregressiva de primeira ordem entre os momentos de avaliação,<sup>73</sup> seguidas de comparações múltiplas de *Bonferroni*<sup>74</sup> para verificar entre quais momentos ocorreram as diferenças.



## **4 Resultados**

---

#### 4. RESULTADOS

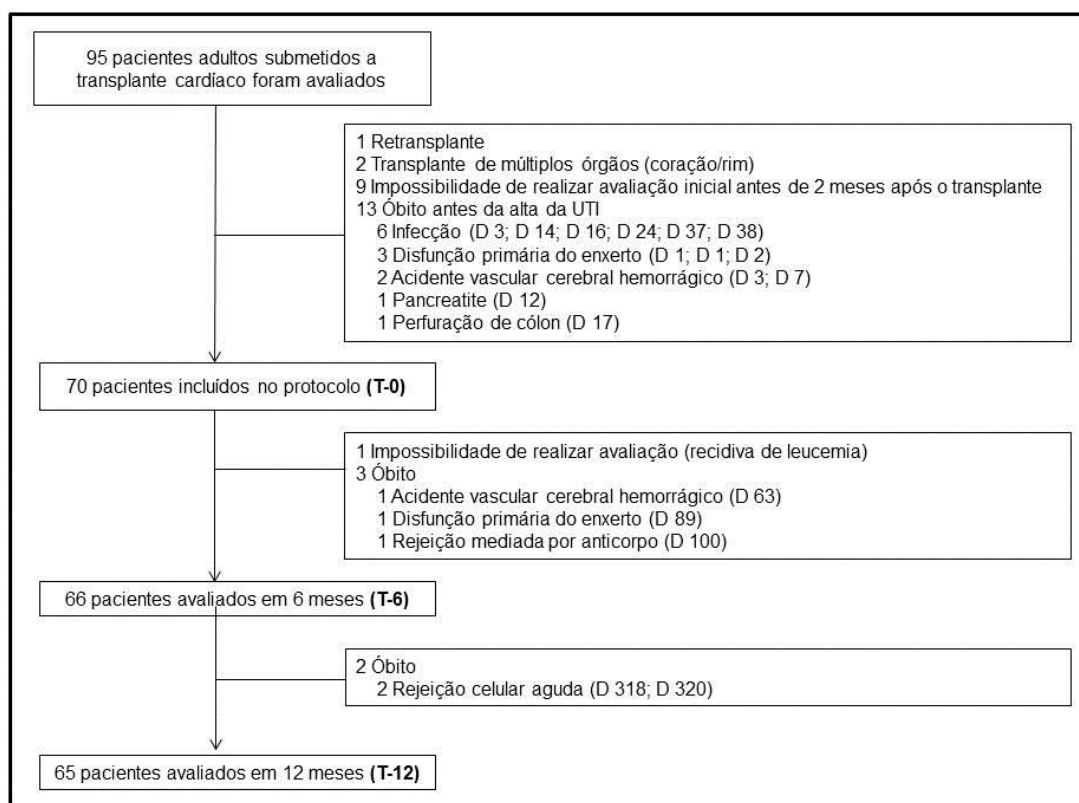
Noventa e cinco pacientes adultos submetidos a transplante cardíaco no Instituto do Coração no período de setembro de 2013 a outubro de 2015 foram avaliados para o estudo. Destes, 25 pacientes foram excluídos pelos seguintes motivos: retransplante (1), transplante de múltiplos órgãos (2), morte antes da alta da UTI (13) e impossibilidade de realizar a avaliação inicial antes de 60 dias após o transplante (9). Foram incluídos no estudo 70 pacientes, conforme ilustrado na Figura 1.

Quatro pacientes não realizaram a avaliação do tempo 6, três por óbito com menos de 6 meses do transplante (sendo as causas de morte: acidente vascular cerebral hemorrágico com 63 dias; doença vascular do enxerto com 89 dias e rejeição mediada por anticorpo em 100 dias) e um paciente por estar internado por tempo prolongado no período da avaliação (recidiva de leucemia e múltiplas infecções). Este último paciente, no entanto, realizou a avaliação de 12 meses.

Cinco pacientes não realizaram a avaliação do tempo 12. Além dos três pacientes que faleceram antes dos 6 meses, ocorreram mais dois óbitos neste período (ambos por rejeição do enxerto, um com 318 dias e o outro com 320 dias do transplante).

A avaliação inicial (T0) foi realizada 22,0 (20,0 – 30,0) dias após o transplante; a avaliação de 6 meses (T6), 199,5 (193,3 – 212,8) dias após; e a de 12 meses (T12), 379,0 (372,0 – 392,0) dias após.

Figura 1. Fluxo dos pacientes durante o estudo.



As características clínicas da população do estudo estão resumidas na tabela 1. Destacamos que 63 (90%) pacientes foram submetidos ao transplante em prioridade por dependência de inotrópico endovenoso ou de balão intra-aórtico. A média de tempo de hospitalização antes do transplante foi de 47,5 (23,0 – 77,8) dias. Destes 63 pacientes, 73,0% estavam hospitalizados em UTI no momento do transplante e, 49,2%, em uso de balão intra-aórtico.

Tabela 1. Características clínicas da população.

<b>Características</b>	<b>n=70</b>
Sexo masculino, n(%)	42 (60)
Idade, anos	45,5 ± 11,9
Peso, kg	61,6 ± 14,6
IMC, kg/m <sup>2</sup>	23,1 ± 4,5
IMC < 20 kg/m <sup>2</sup> , n(%)	19 (27,1)
Raça branca, n(%)	39 (55,7)
Antecedentes, n(%)	
Hipertensão arterial	
Diabetes melito	12 (17,1)
Tabagismo	11 (15,7)
Etilismo	14 (20,0)
História familiar de osteoporose e/ou fratura por fragilidade	7 (10,0)
9 (12,9)	
Etiologia da insuficiência cardíaca, n(%)	
Doença de Chagas	26 (37,1)
Miocardiopatia dilatada idiopática	14 (20,0)
Miocardiopatia isquêmica	9 (12,9)
Outras	21 (30,0)
Transplante em prioridade, n(%)	63 (90)
Duração da hospitalização antes do transplante, dias	47,5 (23,0 – 77,8)

IMC: índice de massa corpórea.

#### 4.1. Análise laboratorial e de biomarcadores de metabolismo ósseo

Os resultados de exames laboratoriais da avaliação inicial, T6 e T12 estão apresentados na tabela 2.

Na avaliação inicial, 92,9% dos pacientes apresentavam 25OHD <30 ng/mL, 75,7% apresentavam 25OHD <20 ng/mL e 20,0% apresentavam 25OHD <10 ng/mL. Os pacientes também apresentavam cálcio sérico no limite inferior da normalidade ( $8,5 \pm 0,7$  ng/mL, valor de referência: 8,5-10,1), fosfatase alcalina elevada ( $138,7 \pm 87,5$  UI/L, valor de referência: 46-116) e o marcador de reabsorção óssea CTX elevado ( $0,79 \pm 0,369$  ng/mL, valor de referência:  $0,299 \pm 0,137$  ng/mL para homens jovens e mulheres pré-menopausa). Essas alterações são sugestivas de defeito de mineralização óssea/osteomalácia e normalizaram em T6 e T12 com a correção da deficiência da vitamina D.

Em relação às alterações evolutivas dos biomarcadores de metabolismo ósseo, observamos aumento dos níveis do marcador de formação óssea P1NP e redução dos níveis do marcador de reabsorção óssea CTX. Estas alterações podem estar relacionadas às doses de glicocorticoides, que eram maiores na primeira avaliação. Os glicocorticoides aumentam a reabsorção óssea e diminuem a formação óssea. Houve também elevação dos níveis séricos de esclerostina entre T0 e T6, sem mudança significativa entre T6 e T12.

Tabela 2. Comparação dos resultados dos exames laboratoriais e biomarcadores de metabolismo ósseo entre avaliação inicial (T0), 6 meses (T6) e 12 meses (T12).

	T0	T6	T12	p
<b>Exames laboratoriais</b>				
Creatinina, mg/dL	1,23 ± 0,49	1,44 ± 0,46 *	1,46 ± 0,57 §	<0,001
Cálcio, mg/dL	8,5 ± 0,7	9,3 ± 0,5 *	9,2 ± 0,5 §	<0,001
Cálcio ionizado, mg/dL	1,22 ± 0,06	1,27 ± 0,05 *	1,27 ± 0,05 §	<0,001
Fósforo, mg/dL	3,0 ± 0,8	4,0 ± 0,6 *	4,0 ± 0,6 §	<0,001
Albumina, mg/dL	2,7 ± 0,5	4,0 ± 0,5 *	4,1 ± 0,4 §	<0,001
Fosfatase alcalina, UI/L	138,7 ± 87,5	116,0 ± 58,2 *	106,3 ± 47,7 §	0,006
25-OH-Vitamina D, ng/mL	15,5 ± 9,1	33,8 ± 11,6 *	34,7 ± 11,4 §	<0,001
PTH, pg/mL	42,9 ± 27,2	40,1 ± 23,4	44,5 ± 25,1	0,307
<b>Biomarcadores ósseos</b>				
P1NP, µg/L	72,1 ± 37,8	114,8 ± 75,2 *	92,1 ± 69,3 #	<0,001
CTX, ng/mL	0,79 ± 0,39	0,59 ± 0,33 *	0,52 ± 0,30 §	<0,001
Esclerostina, pmol/L	25,6 ± 14,7	34,7 ± 16,6 *	38,5 ± 21,0 §	<0,001

\* diferença estatisticamente significativa entre T0 e T6.

# diferença estatisticamente significativa entre T6 e T12.

§ diferença estatisticamente significativa entre T0 e T12.

CTX: telopeptídeo carboxi-terminal do colágeno tipo I; PTH: paratormônio; P1NP: propeptídeo amino-terminal do pro-colágeno tipo I.

#### 4.2. Análise de atividade física habitual

O nível habitual de atividade física foi medido nos tempos 0, 6 e 12 com o uso de um acelerômetro triaxial, o monitor de atividades Dynaport (McRoberts, Holanda). As análises de atividade física estão resumidas na tabela 3.

Observamos um aumento significativo da quantidade de atividade física entre os tempos 0 e 6, demonstradas pelo aumento do gasto energético em atividade, aumento no número de passos, redução da porcentagem de tempo sedentário e redução da porcentagem de pacientes com <5.000 passos por dia. Observamos uma pequena redução no número de passos e aumento na porcentagem de tempo sedentário entre T6 e T12, no entanto, a quantidade de atividade física avaliada por todos os parâmetros foi significativamente maior em T12 quando comparada a T0.

Tabela 3. Comparação da atividade física entre avaliação inicial (T0), 6 meses (T6) e 12 meses (T12).

	<b>T0 (n=64)</b>	<b>T6 (n=62)</b>	<b>T12 (n=58)</b>	<b>p</b>
Gasto energético em atividade, Kcal	340,5 (229,3–436,5)	656,0 (491,0–823,0) *	630,0 (478,0–809,3) §	<0,001
Tempo sedentário, %	90,4 (83,2–92,8)	80,3 (75,8–84,6) *	83,1 (78,2–85,5) #§	<0,001
Número de passos/dia	1.965 (892–3.417)	5.923 (3.813–8.912) *	5.223 (4.047–7.071) #§	<0,001
<5.000 passos/dia, n(%)	54 (84,4)	29 (46,8) *	27 (46,6) §	<0,001

\* diferença estatisticamente significativa entre T0 e T6.

# diferença estatisticamente significativa entre T6 e T12.

§ diferença estatisticamente significativa entre T0 e T12.

### 4.3. Análise de uso de imunossupressores

Em cada avaliação, foi analisada a imunossupressão utilizada. Em relação ao glicocorticoide, foram avaliadas a dose cumulativa e a dose utilizada no momento da avaliação, em equivalente de prednisona. A tabela 4 resume estes achados.

Tabela 4. Imunossupressão utilizada na avaliação inicial (T0), 6 meses (T6) e 12 meses (T12).

	T0	T6	T12
<b>Glicocorticoide</b>			
Dose cumulativa, mg	4.148 (3.524–5.958)	7.993 (5.953–9.863) *	9.355 (6.885–11.330) #§
Dose no momento da avaliação, mg/dia	40,0 (20,0–50,0)	5,0 (5,0–9,4) *	5,0 (2,5–5,0) §
<b>Antiproliferativos</b>			
Azatioprina, n(%)	12 (17.1)	8 (12.1)	5 (7.7)
Micofenolato, n(%)	56 (80.0)	56 (84.8)	55 (84.6)
<b>Inibidores de calcineurina</b>			
Ciclosporina, n(%)	51 (72.9)	28 (42.4)	23 (35.4)
Tacrolimus, n(%)	19 (27.1)	37 (56.1)	42 (64.6)

\* diferença estatisticamente significativa entre T0 e T6.  
 # diferença estatisticamente significativa entre T6 e T12.  
 § diferença estatisticamente significativa entre T0 e T12.

Observamos uso de altas doses cumulativas de glicocorticoide já na primeira avaliação. Isto decorre do protocolo de imunossupressão da instituição em que nos primeiros cinco dias após o transplante, os pacientes



recebem doses altas de glicocorticoide endovenoso. Posteriormente esta dose é reduzida progressivamente, como pode ser evidenciado pela média de dose no momento das avaliações de 6 e 12 meses.

Em relação aos antiproliferativos, a droga mais utilizada desde o tempo 0 é o micofenolato sódico. A azatioprina é utilizada apenas nos pacientes chagásicos, segundo recomendações das diretrizes de transplante cardíaco.<sup>17</sup> No entanto, mesmo neste grupo de pacientes, algumas vezes é necessário a troca para micofenolato por rejeição ou algum efeito colateral da azatioprina, o que justifica a redução do uso desta droga nos tempos 6 e 12.

Quanto aos inibidores de calcineurina, a ciclosporina é em geral a droga inicialmente utilizada, mas em decorrência de episódios de rejeição, ela tende a ser substituída por tacrolimus (maior eficácia em prevenção de rejeição), motivando a redução da frequência de uso de ciclosporina e aumento do tacrolimus ao longo do tempo.

#### 4.4. Análise de densidade mineral óssea e frequência de osteoporose densitométrica

Foram feitas medidas de DMO em coluna lombar (L1 a L4), colo de fêmur e fêmur total. Calculamos a frequência de osteoporose densitométrica em cada sítio na avaliação inicial, tempo 6 e tempo 12. Calculamos também a frequência de presença de osteoporose densitométrica em qualquer sítio. Estas análises são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5. Densidade mineral óssea pela DXA e frequência de osteoporose densitométrica na avaliação inicial (T0), 6 meses (T6) e 12 meses (T12).

	T0	T6	T12	p
<b>Coluna lombar</b>				
DMO, g/cm <sup>2</sup>	0,915 ± 0,141	0,897 ± 0,148 *	0,911 ± 0,140 #§	<0,001
T-score ≤ -2,5, n (%)	17 (24,3)	20 (30,3)	17 (26,2)	0,395
<b>Colo fêmur</b>				
DMO, g/cm <sup>2</sup>	0,775 ± 0,156	0,739 ± 0,149 *	0,742 ± 0,135 §	<0,001
T-score ≤ -2,5, n (%)	7 (10,0)	8 (12,1)	8 (12,3)	0,216
<b>Fêmur total</b>				
DMO, g/cm <sup>2</sup>	0,864 ± 0,155	0,848 ± 0,152 *	0,857 ± 0,137 §	<0,001
T-score ≤ -2,5, n (%)	5 (7,1)	7 (10,6)	4 (6,2)	0,184
<b>Qualquer sítio</b>				
T-score ≤ -2,5, n (%)	19 (27,1)	23 (34,9)	22 (33,9)	0,210

\* diferença estatisticamente significativa entre T0 e T6.

# diferença estatisticamente significativa entre T6 e T12.

§ diferença estatisticamente significativa entre T0 e T12.

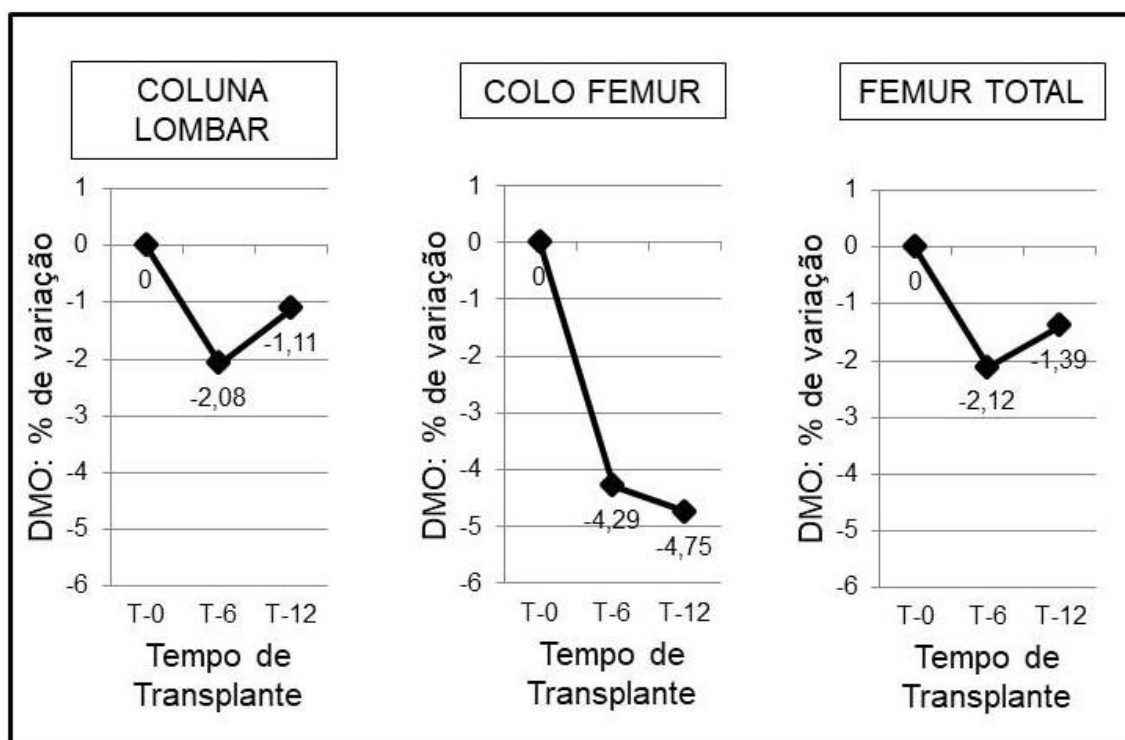
DMO: densidade mineral óssea.

#### 4.4.1. Varição de massa óssea após o transplante cardíaco

A DMO média dos pacientes reduziu nos primeiros 6 meses, com recuperação parcial nos 6 meses subsequentes (conforme demonstrado na figura 2). Ao final do primeiro ano, a média de perda percentual de massa óssea em coluna lombar foi de 1,11%. A média de perda percentual de

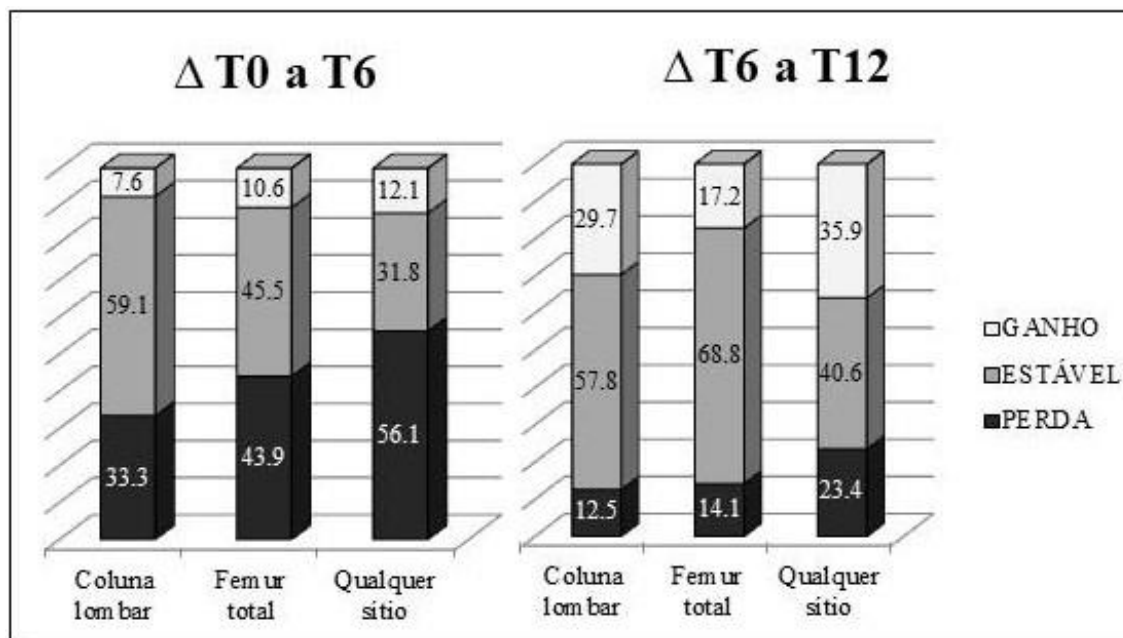
massa óssea em colo de fêmur foi de 4,75% e no fêmur total de 1,39%, no final do primeiro ano.

Figura 2. Variação percentual média da DMO durante o seguimento de 12 meses.



A análise de variação individual de DMO (pela mínima variação significativa) entre a avaliação inicial (T0) e após 6 meses (T6) e entre T6 e T12 está apresentada na figura 3. A maioria dos pacientes (56,1%) apresentaram perda de massa óssea em algum sítio nos primeiros 6 meses (43,9% no fêmur total e 33,3% na coluna lombar). Nos 6 meses subsequentes, a maioria dos pacientes manteve a massa óssea estável (40,6%) ou ganharam massa óssea (35,9%).

Figura 3. Variação de massa óssea entre a avaliação inicial e 6 meses ( $\Delta T0$  a  $T6$ ) e entre 6 e 12 meses ( $\Delta T6$  a  $T12$ ).



#### 4.4.2. Avaliação dos fatores associados à osteoporose

Observamos uma alta frequência de osteoporose densitométrica já na primeira avaliação (27,1%), com um pequeno incremento, não estatisticamente significativo, na sua frequência após 6 meses (34,9%) e 12 meses (33,9%).

A avaliação dos fatores associados a osteoporose na avaliação inicial é apresentada na tabela 6. Pacientes com osteoporose tinham um maior tempo de hospitalização antes do transplante do que os pacientes sem osteoporose: 70,0 (54,0–117,0) vs. 37,0 (17,5–70,0) dias,  $p=0,001$ . Cada dia adicional de hospitalização estava associado a um aumento de 1,3% no risco de osteoporose (OR 1,013, IC95% 1,002–1,023,  $p=0,001$ ). Não houve

diferença significativa na frequência de osteoporose entre homens e mulheres (23,8 vs. 32,1%,  $p=0,584$ ).

Tabela 6. Osteoporose na avaliação inicial (T0).

Variável	Osteoporose T0		OR	IC (95%)		P
	Ausente	Presente		Inferior	Superior	
<b>Idade</b> , anos	44,8 ± 11,4	47,3 ± 13,3	1,018	0,973	1,066	0,442
<b>Sexo masculino</b> , n(%)	32 (62,7)	10 (52,6)	0,660	0,228	1,913	0,442
<b>Peso</b> , kg	63,6 ± 15,2	56,2 ± 11,6	0,961	0,921	1,003	0,059
<b>IMC</b> , kg/m <sup>2</sup>	23,3 ± 4,6	22,4 ± 4,1	0,954	0,843	1,079	0,456
<b>Hipertensão</b> , n(%)	7 (13,7)	5 (26,3)	2,245	0,614	8,202	0,286
<b>Diabetes mellitus</b> , n(%)	9 (17,6)	2 (10,5)	0,549	0,107	2,809	0,715
<b>Tabagismo</b> , n(%)	11 (21,6)	3 (15,8)	0,682	0,168	2,771	0,744
<b>Etilismo</b> , n(%)	6 (11,8)	1 (5,3)	0,417	0,047	3,710	0,665
<b>História familiar OP ou fratura</b> , n(%)	6 (11,8)	3 (15,8)	1,406	0,314	6,294	0,696
<b>Tempo de hospitalização</b> , dias	37 (17,5 – 70)	70 (54 – 117)	1,013	1,002	1,023	0,001
<b>Creatinina</b> , mg/dL	1,25 ± 0,53	1,21 ± 0,41	0,829	0,273	2,518	0,745
<b>Cálcio total</b> , mg/dL	8,5 ± 0,8	8,5 ± 0,4	1,226	0,544	2,765	0,628
<b>Fósforo</b> , mg/dL	3,0 ± 0,9	3,0 ± 0,6	0,988	0,525	1,858	0,962
<b>Fosfatase alcalina</b> , UI/L	136,6 ± 98,0	144,2 ± 51,7	1,001	0,995	1,007	0,750
<b>25-OH-Vitamina D</b> , ng/mL	15,1 ± 8,1	16,5 ± 11,5	1,017	0,960	1,076	0,577
<b>PTH</b> , pg/mL	44,5 ± 30,7	38,5 ± 13,5	0,990	0,966	1,014	0,415
<b>P1NP</b> , µg/L	69,4 ± 34,0	79,1 ± 47,0	1,007	0,993	1,021	0,356
<b>CTX</b> , ng/mL	0,83 ± 0,42	0,68 ± 0,30	0,312	0,061	1,587	0,157
<b>Esclerostina</b> , pmol/L	24,4 ± 14,6	26,8 ± 15,2	1,011	0,975	1,049	0,565
<b>Massa gorda</b> , kg	14,76 ± 7,88	12,42 ± 4,88	0,949	0,871	1,034	0,147
<b>Massa magra</b> , kg	46,29 ± 10,71	41,61 ± 9,34	0,954	0,901	1,010	0,099

CTX: telopeptídeo carboxi-terminal do colágeno tipo I; IC (95%): intervalo de confiança de 95%; IMC: índice de massa corpórea; OP: osteoporose; OR: Odds Ratio; PTH: paratormônio; P1NP: propeptídeo amino-terminal do pro-colágeno tipo I.

#### 4.4.3. Avaliação dos fatores associados à perda de massa óssea

Como a maior perda de massa óssea foi observada nos primeiros 6 meses de seguimento, avaliamos a correlação de variáveis clínicas, laboratoriais, biomarcadores de metabolismo ósseo, parâmetros da HR-pQCT, nível de atividade física habitual e dose cumulativa de glicocorticoides com a presença de perda significativa de massa óssea (em qualquer sítio) neste período. Esta análise é apresentada na tabela 7.

Após análise multivariada (tabela 8), peso e nível sérico de fósforo mostraram associação com perda significativa de massa óssea entre T0 e T6.

Tabela 7. Perda significativa de massa óssea entre T0 e T6.

Variável (tempo 0)	Perda massa óssea		OR	IC (95%)		P
	Ausente	Presente		Inferior	Superior	
Idade, anos	43,7 ± 12,9	46,4 ± 11,1	1,02	0,98	1,06	0,366
Sexo masculino, n(%)	14 (48,3)	25 (67,6)	2,23	0,82	6,08	0,114
Peso, kg	55,7 ± 11,5	64,9 ± 11,9	1,05	1,01	1,10	0,008
Tempo de hospitalização, dias	63,9 ± 54,0	59,8 ± 56,3	1,00	0,99	1,01	0,766
Creatinina, mg/dL	1,09 ± 0,36	1,30 ± 0,50	3,41	0,91	12,69	0,057
Cálcio total, mg/dL	8,5 ± 0,5	8,5 ± 0,9	0,92	0,45	1,86	0,812
Fósforo ,mg/dL	2,8 ± 0,7	3,2 ± 0,9	1,90	0,98	3,66	0,049
Fosfatase alcalina, UI/L	138,9 ± 45,3	133,2 ± 113,0	1,00	0,99	1,01	0,800
25-OH-Vitamina D, ng/mL	14,0 ± 10,1	17,0 ± 8,5	1,04	0,98	1,10	0,202
PTH, pg/mL	40,3 ± 22,2	43,1 ± 29,9	1,00	0,99	1,02	0,679
P1NP, µg/L	73,0 ± 45,4	69,8 ± 30,7	1,00	0,99	1,01	0,732
CTX, ng/mL	0,74 ± 0,27	0,83 ± 0,47	1,82	0,50	6,71	0,339
Esclerostina, pmol/L	20,6 ± 16,1	27,5 ± 14,0	1,03	1,00	1,07	0,067
Conteúdo mineral ósseo, kg	2,00 ± 0,37	2,32 ± 0,64	1,59	0,73	3,51	0,243
Massa gorda, kg	12,38 ± 6,47	14,64 ± 7,30	1,05	0,97	1,14	0,198
Dose cumulativa de glicocorticoide #	8.597 ± 3.507	7.922 ± 2057	1,00	1,00	1,00	0,363
<b>Avaliação de atividade física #</b>						
Número de passos	7.106 ± 4.086	5.961 ± 3.385	1,00	1,00	1,00	0,233
Tempo Sedentário (%)	79,2 ± 7,6	80,8 ± 7,2	1,03	0,96	1,11	0,409
Gasto energético no exercício (Kcal)	627,4 ± 241,3	690,8 ± 286,7	1,00	1,00	1,00	0,365
<5.000 passos/24h - n(%)	11 (42,3)	18 (50,0)	1,36	0,49	3,77	0,549
<b>HRpQCT - Tíbia</b>						
Tb.vBMD, mg HA/cm <sup>3</sup>	149,7 ± 44,5	161,5 ± 47,0	1,01	1,00	1,02	0,308
BV/TV	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,04	&			0,304
Tb.N, 1/mm	1,66 ± 0,34	1,85 ± 0,44	3,40	0,91	12,70	0,064
Tb.Th, mm	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,02	&			0,650
Tb.Sp, mm	0,54 ± 0,18	0,50 ± 0,17	0,27	0,01	5,17	0,388
Ct.vBMD, mg HA/cm <sup>3</sup>	919,5 ± 52,4	896,9 ± 85,9	1,00	0,99	1,00	0,200
Ct.Th, mm	1,17 ± 0,23	1,25 ± 0,34	2,59	0,46	14,56	0,259
Stiffnes, N/mm *	209.709 ± 52.772	231.452 ± 69.800	1,06	0,97	1,15	0,18
Failure load, N #	9.972 ± 2.432	11.024 ± 3.242	1,14	0,95	1,36	0,16
Apparent modulus, N/mm <sup>2</sup> #	2.363 ± 479	2.384 ± 561	1,08	0,42	2,83	0,87

# variáveis avaliadas no tempo 6.

& não é possível estimar.

CTX: telopeptídeo carboxi-terminal do colágeno tipo I; IC (95%): intervalo de confiança de 95%; OR: Odds Ratio; PTH: paratormônio; P1NP: propeptídeo amino-terminal do procolágeno tipo I; Tb.vBMD: densidade volumétrica óssea trabecular; BV/TV: volume ósseo trabecular; Tb.N: número trabecular; Tb.Th: espessura trabecular; Tb.Sp: separação trabecular; Ct.vBMD: densidade volumétrica óssea cortical; Ct.Th: espessura cortical.

Tabela 8. Análise multivariada de variáveis associadas a perda significativa de massa óssea entre a avaliação inicial (T0) e 6 meses (T6).

Variáveis	OR	IC 95%	p
<b>Modelo Saturado</b>			
Peso	1,05	0,99 – 1,12	0,135
Creatinina	2,46	0,58 – 10,39	0,222
Fósforo	2,68	1,13 – 6,38	0,025
Esclerostina	1,03	0,98 – 1,08	0,271
<i>Tb.N</i> , 1/mm	1,72	0,14 – 21,04	0,670
<b>Modelo final</b>			
Peso	1,08	1,02 – 1,13	0,004
Fósforo	2,35	1,14 – 4,84	0,021

IC (95%): intervalo de confiança de 95%; OR: Odds Ratio; *Tb.N*: número trabecular.

#### 4.5. Análise da microarquitetura óssea

Todos os pacientes incluídos no estudo realizaram, pelo menos em algum momento, avaliação da microarquitetura óssea por HRpQCT. No entanto, por problemas técnicos do equipamento, esta avaliação não pode ser feita algumas vezes. De qualquer modo, 62 pacientes fizeram a avaliação de microarquitetura em pelo menos dois momentos e 43 pacientes conseguiram realizar as três avaliações.

A análise da HR-pQCT mostrou que os parâmetros de microarquitetura óssea na avaliação inicial estavam associados a osteoporose. Pacientes com osteoporose tinham menor densidade volumétrica óssea trabecular (*Tb.vBMD*: 128,18±51,88 vs. 168,18±36,84 mg



HA/cm<sup>3</sup>, p=0,005), menor volume ósseo trabecular (*BV/BT*: 0,107±0,04 vs. 0,140±0,03, p=0,005), menor número trabecular (*Tb.N*: 1,51±0,41 vs. 1,89±0,35 1/mm, p<0,001), maior espaçamento entre trabéculas (*Tb.Sp*: 0,645±0,212 vs. 0,472±0,098 mm, p=0,002) e menor espessura cortical (*Ct.Th*: 1,08±0,33 vs. 1,26±0,26 mm, p=0,018) comparado com os pacientes sem osteoporose. Em relação às propriedades biomecânicas, pacientes com osteoporose tinham valores menores de *stiffness* (188.112±63.960 vs. 236.732±57.692 N/mm, p=0,004), *failure load* (8.932±2.966 vs. 11.279±2.677 N, p=0,003) e *apparent modulus* (2.172±555 vs. 2.463±474 N/mm<sup>2</sup>, p=0,035).

Para que todos os pacientes pudessem ser incluídos na análise das variações dos parâmetros de microarquitetura no tempo (entre inicial e 6 meses e entre 6 e 12 meses), cada paciente foi avaliado individualmente através de análise de medidas repetidas (paciente comparado com ele mesmo). As médias das variações individuais dos parâmetros da HRpQCT avaliados nos diferentes tempos (entre T0–T6 e T6–T12) estão apresentadas na tabela 9.

A figura 4 demonstra de forma mais clara as variações percentuais das médias de diferenças dos parâmetros de microarquitetura avaliados pela HR-pQCT. Observamos que nos primeiros 6 meses, os pacientes apresentam um comprometimento mais proeminente de osso trabecular. Nos 6 meses subsequentes, os pacientes mantêm deterioração, menos intensa, do osso trabecular e apresentam comprometimento mais pronunciado de osso cortical. As propriedades biomecânicas estimadas no

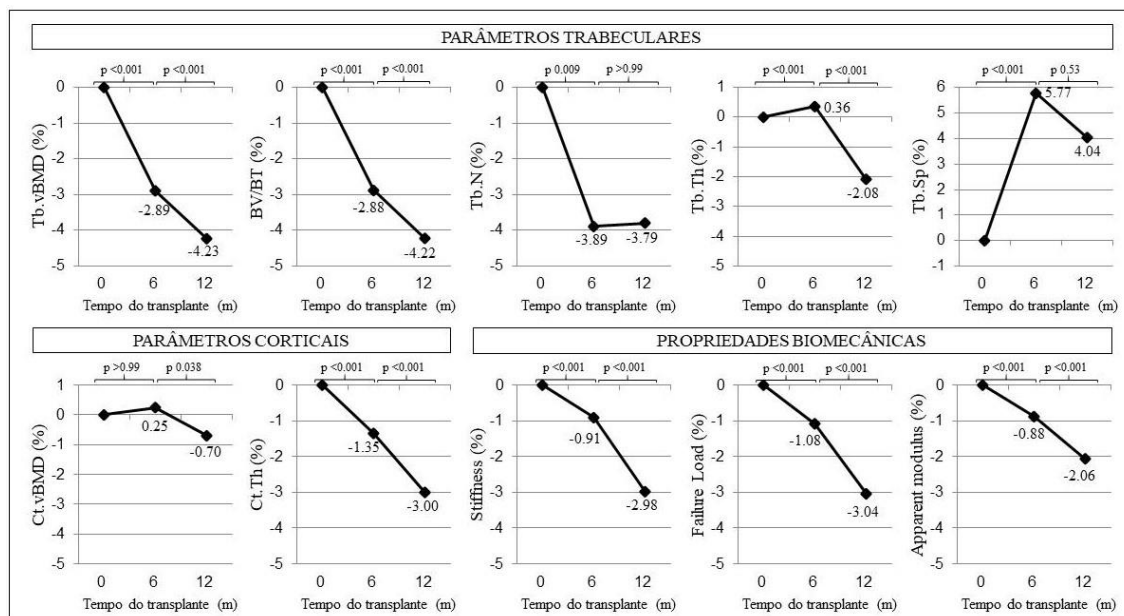
exame também se deterioraram durante a evolução, com reduções dos três parâmetros analisados (*stiffness*, *failure load* e *apparent modulus*) em T6 quando comparados a T0 e em T12 quando comparados a T6 ( $P < 0,001$ ).

Tabela 9. Parâmetros da HR-pQCT na avaliação inicial (T0) e as médias das variações individuais dos parâmetros entre o início e 6 meses ( $\Delta T6-T0$ ) e entre 6 e 12 meses ( $\Delta T12-T6$ ).

	Inicial (T0)	$\Delta T6-T0$	p	$\Delta T12-T6$	p
<b>Parâmetros trabeculares</b>					
<i>Tb.vBMD</i> , mg HA/cm <sup>3</sup>	157,0 ± 45,0	-4,54 ± 0,09	<0,001	-2,10 ± 0,09	<0,001
<i>BV/TV</i>	0,131 ± 0,037	-0,00377 ± 0,00007	<0,001	-0,00176 ± 0,00008	<0,001
<i>Tb.N</i> , 1/mm	1,79 ± 0,41	-0,0697 ± 0,02346	0,009	0,00181 ± 0,00004	>0,999
<i>Tb.Th</i> , mm	0,074 ± 0,017	0,00027 ± 0,00003	<0,001	-0,00181 ± 0,00004	<0,001
<i>Tb.Sp</i> , mm	0,520 ± 0,159	0,030 ± 0,006	<0,001	-0,009 ± 0,007	0,53
<b>Parâmetros corticais</b>					
<i>Ct.vBMD</i> , mg HA/cm <sup>3</sup>	907,0 ± 71,3	2,30 ± 3,20	>0,999	-8,68 ± 3,48	0,038
<i>Ct.Th</i> , mm	1,21 ± 0,29	-0,0163 ± 0,00055	<0,001	-0,02 ± 0,0006	<0,001
<b>Propriedades biomecânicas</b>					
Stiffness, N/mm	222.735 ± 63.265	-2.021 ± 119	<0,001	-4.617 ± 133	<0,001
Failure load, N	10.604 ± 2.942	-114 ± 5	<0,001	-208 ± 6	<0,001
Apparent modulus, N/mm <sup>2</sup>	2.380 ± 511	-21 ± 1	<0,001	-28 ± 1	<0,001

*Tb.vBMD*: densidade volumétrica óssea trabecular; *BV/TV*: volume ósseo trabecular; *Tb.N*: número trabecular; *Tb.Th*: espessura trabecular; *Tb.Sp*: separação trabecular; *Ct.vBMD*: densidade volumétrica óssea cortical; *Ct.Th*: espessura cortical.

Figura 4. Variações percentuais das médias de diferenças dos parâmetros da HR-pQCT.



#### 4.6. Análise de fraturas

Imagens da coluna torácica e lombar foram obtidas por DXA nos tempos 0, 6 e 12, utilizando o mesmo equipamento de densitometria (Hologic QDR 4500, Bedford, MA, EUA). Por estas imagens foram identificados os pacientes que apresentavam fratura vertebral em cada uma das avaliações, conforme apresentado na tabela 10. As imagens de dois pacientes não foram avaliáveis em nenhum dos tempos (qualidade ruim).

Tabela 10. Pacientes com fratura vertebral na avaliação inicial (T0), 6 meses (T6) e 12 meses (T12).

	T0 (n=68)	T6 (n=64)	T12 (n=63)
<b>Fratura vertebral, n(%)</b>	16 (23,5)	19 (29,7)	18 (28,6)

Observamos uma alta prevalência de fraturas já na primeira avaliação (23,5%). Apenas três pacientes que não apresentavam fratura na avaliação inicial tiveram fratura identificada no tempo 6; e apenas um paciente que não apresentava fratura nos tempos 0 e 6 teve fratura identificada no tempo 12. Todas as fraturas foram grau 1.

Avaliamos a correlação de variáveis clínicas, laboratoriais, biomarcadores de metabolismo ósseo, dados da DXA e dados da HRpQCT com a presença de fratura vertebral. Na tabela 11 apresentamos a análise feita no tempo 0.

Pacientes com fratura vertebral tinham menor massa gorda do que aqueles sem fratura ( $9,48 \pm 3,42$  vs.  $15,13 \pm 6,80$  kg,  $p < 0,001$ ). Entre os pacientes com fratura, 87,5% (14/16) eram homens e 12,5% (2/16) eram mulheres ( $p = 0,011$ ).

Após análise multivariada (tabela 12), apenas a massa gorda foi identificada como variável independentemente associada com fratura no tempo 0. Para facilitar o entendimento da influência desta variável como fator de risco para fratura vertebral, calculamos o *Odds Ratio* da redução de massa gorda (OR: 1,23, IC 95%: 1,04 – 1,47,  $p = 0,012$ ), ou seja, para cada um kg de redução de massa gorda, o risco de fratura aumenta em 23%.

Tabela 11. Fratura vertebral pela DXA na avaliação inicial (T0).

Variável	Fratura T0		OR	IC (95%)		P
	Ausente	Presente		Inferior	Superior	
Idade, anos	46,3 ± 10,9	44,4 ± 14,8	0,99	0,94	1,03	0,580
Sexo masculino, n(%)	27 (51,91)	14 (87,5)	6,48	1,34	31,41	0,011
Peso, kg	62,0 ± 14,4	59,7 ± 11,4	0,99	0,95	1,03	0,575
IMC, kg/m <sup>2</sup>	23,4 ± 4,6	21,8 ± 3,4	0,91	0,79	1,05	0,187
Tempo de hospitalização, dias	62,7 ± 58,7	53,4 ± 40,2	1,00	0,99	1,01	0,558
Creatinina, mg/dL	1,23 ± 0,49	1,29 ± 0,54	1,23	0,41	3,66	0,719
Cálcio total, mg/dL	8,5 ± 0,8	8,5 ± 0,4	1,05	0,45	2,46	0,913
Fósforo, mg/dL	3,0 ± 0,9	3,0 ± 0,8	0,95	0,49	1,85	0,885
Fosfatase alcalina, UI/L	137,7 ± 96,8	142,7 ± 57,8	1,00	1,00	1,01	0,846
25-OH-Vitamina D, ng/mL	14,3 ± 8,4	18,4 ± 10,3	1,05	0,99	1,12	0,117
PTH, pg/mL	43,8 ± 28,4	36,5 ± 21,5	0,99	0,96	1,02	0,349
P1NP, µg/L	71,5 ± 35,7	64,3 ± 26,1	0,99	0,98	1,01	0,457
CTX, ng/mL	0,74 ± 0,34	0,83 ± 0,41	1,89	0,40	8,96	0,425
Esclerostina, pmol/L	25,9 ± 14,9	20,2 ± 16,3	0,97	0,93	1,01	0,195
Osteoporose em coluna lombar, n(%)	11 (21,2)	6 (33,3)	1,69	0,49	5,91	0,502
Osteoporose em qualquer sítio, n(%)	13 (25,0)	6 (33,3)	1,36	0,40	4,66	0,747
Conteúdo mineral ósseo, kg	2,17 ± 0,57	2,26 ± 0,42	1,38	0,49	3,93	0,548
Massa gorda, kg	15,13 ± 6,80	9,48 ± 3,42	0,79	0,67	0,94	<0,001
Massa magra, kg	44,78 ± 10,71	45,96 ± 8,79	1,01	0,96	1,07	0,700
DMO em coluna lombar, g/cm <sup>2</sup>	0,920 ± 0,140	0,900 ± 0,14	0,26	0,00	17,80	0,537
<b>HRpQCT</b>						
Tb.vBMD, mg HA/cm <sup>3</sup>	154,6 ± 44,6	165,5 ± 48,3	1,01	0,99	1,02	0,406
BV/TV	0,13 ± 0,04	0,14 ± 0,04	&			0,401
Tb.N, 1/mm	1,80 ± 0,41	1,78 ± 0,40	0,91	0,22	3,67	0,893
Tb.Th, mm	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,02	&			0,366
Tb.Sp, mm	0,52 ± 0,15	0,50 ± 0,22	0,48	0,02	15,97	0,688
Ct.vBMD, mg HA/cm <sup>3</sup>	906,1 ± 76,1	904,8 ± 58,8	1,00	0,99	1,01	0,951
Ct.Th, mm	1,19 ± 0,29	1,29 ± 0,28	3,24	0,41	25,78	0,270
Stiffness, N/mm *	214.118±59.163	247.576±69.831	1,10	0,99	1,21	0,051
Failure load, N #	10.216 ± 2.758	11.719 ± 3.249	1,22	0,99	1,51	0,058
Apparent modulus, N/mm <sup>2</sup> #	2.353 ± 537	2.457 ± 436	1,66	0,51	5,47	0,409

\* para cálculo de OR: variável/10.000.

# para cálculo de OR: variável/1.000.

&amp; não é possível estimar.

CTX: telopeptídeo carboxi-terminal do colágeno tipo I; IC (95%): intervalo de confiança de 95%; OR: Odds Ratio; PTH: paratormônio; P1NP: propeptídeo amino-terminal do procolágeno tipo I; Tb.vBMD: densidade volumétrica óssea trabecular; BV/TV: volume ósseo trabecular; Tb.N: número trabecular; Tb.Th: espessura trabecular; Tb.Sp: separação trabecular; Ct.vBMD: densidade volumétrica óssea cortical; Ct.Th: espessura cortical.

Tabela 12. Análise multivariada de variáveis associadas a fratura em T0.

Variáveis	OR	IC 95%	p
Sexo masculino	2,59	0,35 – 19,31	0,352
Massa gorda, kg	0,81	0,68 – 0,96	0,012
Stiffness, N/mm *	1,07	0,93 – 1,23	0,342

\* para cálculo de OR: variável/10.000.

IC (95%): intervalo de confiança de 95%; OR: Odds Ratio.

As mesmas análises foram feitas com os achados no tempo 12, mas como o número de novos pacientes com fratura foi pequeno, não houve diferença significativa dos resultados, sendo que a única variável associada a fratura, após análise multivariada, foi massa gorda.

## **5 Discussão**

---

## 5. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a fazer uma avaliação longitudinal e completa da DMO, microarquitetura e parâmetros de metabolismo ósseo, incluindo biomarcadores de formação/reabsorção óssea, em receptores de transplante cardíaco durante o primeiro ano após o procedimento. Os principais achados do estudo foram a alta prevalência de osteoporose densitométrica, deficiência de vitamina D, anormalidades de biomarcadores ósseos e fraturas vertebrais já na avaliação inicial.

Os dados de marcadores bioquímicos ósseos na avaliação basal (cálcio no limite inferior da normalidade, nível de vitamina D de 15 ng/mL, elevação de fosfatase alcalina) sugerem distúrbio de mineralização óssea em decorrência da deficiência de vitamina D e cálcio, o qual foi corrigido com suplementação de vitamina D e dieta rica em cálcio. Estas recomendações devem ser feitas antes da introdução de outras terapias medicamentosas para osteoporose, já que o uso de bisfosfonatos em pacientes com deficiência de vitamina D e cálcio pode ser menos efetivo e pode inclusive exacerbar defeito de mineralização/osteomalácia.<sup>76-78</sup> Carmel et al.<sup>79</sup> mostraram que, em mulheres pós-menopausa com osteoporose, aquelas com níveis de 25OHD  $\geq 33$  ng/mL tinham 4,5 vezes mais chance de terem uma resposta favorável a bisfosfonato, enquanto que a redução de 1 ng/mL do nível sérico de 25OHD foi associado com redução de 5% da chance de resposta. De fato, bisfosfonatos reduzem o *turnover* ósseo e aumentam mineralização secundária do osso, que é prejudicada nos pacientes com



deficiência de vitamina D.<sup>78</sup> Este é um ponto de grande importância pois a deficiência de vitamina D é altamente prevalente em receptores de transplante de coração (92,9% da população do estudo e mais de 90% na literatura).<sup>40</sup>

Perda de massa óssea e fraturas por fragilidade são importantes complicações do transplante cardíaco. Estudos prévios demonstraram que uma rápida perda óssea ocorre mais comumente no primeiro ano após o transplante.<sup>13,23,24,26,27,80</sup> No estudo atual, a perda óssea ocorreu principalmente nos primeiros seis meses de transplante, enquanto que nos 6 meses subsequentes a maioria dos pacientes manteve a massa óssea estável ou teve ganho de massa. Curiosamente, a avaliação de microarquitetura utilizando *HR-pQCT* demonstrou perda óssea contínua durante o ano de seguimento, com maior impacto em osso trabecular nos primeiros 6 meses e no osso cortical nos 6 meses subsequentes.

No estudo atual, 28% dos pacientes tiveram fraturas detectadas após o transplante cardíaco, resultado similar ao reportado previamente na literatura (21-44%).<sup>24-26</sup> Surpreendentemente, nós demonstramos que a maioria das fraturas vertebrais já estavam presentes na primeira avaliação após o transplante, correspondendo a 23% dos pacientes. De fato, o período peritransplante está associado a maior risco de fratura, em decorrência dos efeitos deletérios da insuficiência cardíaca avançada e consequentemente da má condição óssea prévia ao transplante, assim como as altas doses de glicocorticoides utilizadas logo após o transplante, que podem ter um impacto ainda maior no contexto de deficiência de cálcio e vitamina D. No

estudo, fraturas vertebrais foram associadas com baixa massa gorda. Baixo peso é um fator de risco para fraturas osteoporóticas, mas não é independente da DMO e da probabilidade de fratura determinada pelo FRAX (*Fracture Risk Assessment Tool*).<sup>81,82</sup> Além disso, um baixo peso e uma baixa massa gorda podem ser sinais de síndrome de fragilidade, identificada em até 74% dos pacientes com insuficiência cardíaca avançada.<sup>83</sup>

Em relação ao tratamento da osteoporose, existe preocupação em relação à segurança dos bisfosfonatos após o transplante cardíaco. Estudos controlados e randomizados e estudos observacionais sugerem um aumento significativo no risco de fibrilação atrial com necessidade de hospitalização com uso de bisfosfonatos na população geral, especialmente com drogas parenterais.<sup>51,52</sup> Estudos com bisfosfonatos em pacientes transplantados cardíacos não mostraram aumento de eventos adversos sérios, mas o número de pacientes é pequeno.<sup>13</sup> Níveis baixos de cálcio, secundário a baixa ingestão e/ou deficiência de vitamina D, podem aumentar o risco de evento adverso cardiovascular com uso de bisfosfonatos nesta população.

Estudos prévios mostraram que bisfosfonatos (alendronato, ibandronato, pamidronato, etidronato, risendronato, clodronato, zoledronato) previnem perda de massa óssea após o transplante cardíaco, especialmente em coluna lombar, mas o efeito na prevenção de fraturas ainda são controversos.<sup>6-13,84</sup> Nosso achado de defeito de mineralização em decorrência de deficiência de vitamina D/cálcio podem explicar, ao menos em parte, a ineficácia dos bisfosfonatos na prevenção de fraturas após o transplante cardíaco. Um estudo avaliando 149 receptores de transplante

cardíaco tratados com alendronato ou calcitriol por um ano não mostrou diferenças nas taxas de fraturas entre os grupos.<sup>9</sup> Curiosamente, o nível de vitamina D não foi avaliado, mas o nível de PTH reduziu no grupo calcitriol (de  $44\pm 5$  para  $29\pm 5$  pg/mL) e aumentou no grupo alendronato (de  $39\pm 4$  para  $51\pm 4$  pg/mL) na avaliação de 6 meses ( $p < 0,001$ ).<sup>9</sup> Estas alterações no nível de PTH podem refletir deficiência de vitamina D e defeito de mineralização óssea. De forma semelhante, outro estudo com 48 receptores de transplante cardíaco avaliou etidronato vs. calcidiol, ambos associados a carbonato de cálcio. Houve menos fratura vertebral no grupo calcidiol do que no grupo etidronato (2 vs. 8 novas fraturas vertebrais).<sup>55</sup> O nível basal de 25OHD era de  $13,0\pm 7,5$  e  $12,5\pm 4,4$  ng/mL, respectivamente.<sup>55</sup>

As limitações do estudo incluem o tamanho limitado da amostra e o fato de ter sido realizado em um único centro, no qual dispositivos de assistência ventricular de longa permanência não são disponíveis. Além disso, dados pré-transplante não estão disponíveis, pois a maioria dos pacientes foi submetida à avaliação para transplante pela primeira vez durante a internação por descompensação aguda de insuficiência cardíaca e sem condições clínicas de realizar avaliações de DMO e microarquitetura óssea. É ainda importante ressaltar que nossos achados podem estar relacionados às características da população, como a alta frequência de IMC baixo, longa duração de hospitalizações antes do transplante e alta mortalidade após o transplante, o que pode sugerir uma população de maior fragilidade.

Uma característica importante da população do estudo é que 90% dos pacientes estavam hospitalizados no momento do transplante e com um longo período de hospitalização antes procedimento (47,5 dias). Tal achado pode, ao menos em parte, ser explicado pela não disponibilidade de dispositivos de assistência ventricular de longa permanência como ponte para transplante na nossa instituição. Nossos dados se contrastam com os dados da *International Society for Heart and Lung Transplantation*. Neste registro, no qual é relatado a condição dos receptores de transplante cardíaco em dezenas de centros em todo o mundo, metade dos pacientes estavam em uso de dispositivo de longa permanência no momento do transplante e apenas 44,4% dos receptores estavam hospitalizados anteriormente ao transplante.<sup>75</sup> De fato, a alta prevalência de osteoporose na avaliação basal (27%) observada na população do estudo estava associada ao tempo de hospitalização previamente ao transplante. Insuficiência cardíaca avançada, hospitalização, déficit nutricional, baixa exposição solar, inflamação sistêmica, falta de atividade física e distúrbios hormonais podem ter contribuído para este achado.<sup>21</sup>

É importante destacar que pacientes com insuficiência cardíaca avançada, na fase final da doença, exibem desarranjos metabólicos e inflamatórios sistêmicos que levam a alto risco de caquexia.<sup>85</sup> Caquexia é caracterizada pela perda não intencional de peso (não relacionado a edema), associada a anorexia, fadiga, diminuição de força muscular e alterações bioquímicas (como elevação de marcadores inflamatórios e redução de albumina sérica).<sup>86</sup>

Estudos têm demonstrado que pacientes com dispositivos de assistência ventricular esquerda de longa permanência apresentam, após alguns meses, reversão de quadro de caquexia, com melhora de níveis de albumina e colesterol total, além de reversão de resistência a insulina e da ativação inflamatória sistêmica.<sup>87-90</sup> Pacientes com dispositivos de assistência tendem a ganhar peso após o implante, especialmente quando estavam com baixo peso antes.<sup>91</sup> Os mecanismos que levam a esta recuperação metabólica incluem normalização da perfusão intestinal e de musculatura esquelética, melhora da congestão hepática e esplâncnica, facilitando uma maior ingestão alimentar e aumento de níveis de atividade física.<sup>85</sup>

Em nosso serviço, assim como em muitos outros serviços de transplante cardíaco no Brasil e América Latina, em que dispositivos de assistência ventricular de longa permanência não estão disponíveis para suporte do paciente com insuficiência cardíaca terminal, a manutenção destes indivíduos até o transplante cardíaco é feita com uso de drogas inotrópicas e balão intra-aórtico. Tais assistências auxiliam na correção do baixo débito cardíaco e compensação da insuficiência cardíaca, no entanto, limitam a mobilização do paciente, muitas vezes restringindo-o ao leito de UTI. No estudo atual, dos 63 pacientes que transplantaram durante hospitalização (em prioridade para o transplante), 73,0% estavam em UTI e 49,2% em uso de balão intra-aórtico.

Tais achados nos faz acreditar que os cuidados para prevenção e tratamento do comprometimento ósseo deveriam ser estabelecidos para

todos os pacientes com insuficiência cardíaca grave e candidatos a transplante cardíaco antes do procedimento. Dentre estes cuidados, o estudo atual demonstra a importância da correção da deficiência da vitamina D e cálcio. Além disso, acreditamos que um melhor suporte hemodinâmico do paciente em fila de transplante, sobretudo com terapias que permitam prevenção da evolução ou até mesmo reversão da caquexia, possa ter impacto positivo na melhora do comprometimento ósseo do transplantado cardíaco. Novos estudos que avaliem o efeito destas terapias no metabolismo ósseo são necessários.

## **6 Conclusões**

---

## 6. CONCLUSÕES

Altas frequências de osteoporose densitométrica, deficiência de vitamina D, anormalidades de biomarcadores ósseos e fraturas vertebrais já estão presentes logo após o transplante cardíaco. Dessa forma, cuidados para prevenção e tratamento do comprometimento ósseo deveriam ser estabelecidos para todos os pacientes com insuficiência cardíaca grave e candidatos a transplante cardíaco antes do procedimento.

Deve ser destacado que deficiência de vitamina D é altamente prevalente em pacientes transplantados cardíacos e pode contribuir para aumento do risco de fratura em decorrência de defeito de mineralização óssea. Conseqüentemente, a suplementação de vitamina D e cálcio deve ser o primeiro passo na correção do defeito de mineralização, antes do início de outras terapias para osteoporose. Atenção especial deve ser dada a pacientes com longo período de hospitalização antes do transplante e com baixa massa gorda.





## Anexo 1 – TCLE

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE  
SÃO PAULO-HCFMUSP**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME: .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO:  M  F   
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: ..... SEXO:  M  F   
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

**DADOS SOBRE A PESQUISA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação da Densidade Óssea e Microarquitetura Óssea em Pacientes Transplantados Cardíacos.
2. PESQUISADOR EXECUTANTE: Luis Fernando Bernal da Costa Seguro  
CARGO/FUNÇÃO: Médico assistente  
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 108.296  
UNIDADE DO HCFMUSP: Núcleo de Transplante – Instituto do Coração  
  
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Fernando Bacal  
CARGO/FUNÇÃO: Médico Diretor do Núcleo de Transplante  
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 66.061  
UNIDADE DO HCFMUSP: Núcleo de Transplante – Instituto do Coração

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO  RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

1 – Você está sendo convidado(a) a participar deste estudo, onde iremos ver as alterações ósseas que ocorrem após o transplante cardíaco. O transplante cardíaco aumenta o risco de osteoporose (quando os ossos ficam mais fracos) e fraturas.

2 – Caso aceite participar do estudo, será aplicado questionário com perguntas sobre a doença do coração (causa, tempo de doença), uso de medicações, fraturas (se você já quebrou algum osso), história na família de osteoporose ou fratura, alimentação (se você come ou bebe alimentos ricos em cálcio) e atividade física. Serão também realizadas medidas de peso, altura e circunferência abdominal. O senhor(a) fará exames em três momentos (no início do estudo, em seis meses e em um ano):

- Será colhido sangue (20 mL, aproximadamente 4 colheres de sopa);
- Será realizado um exame de densitometria óssea (exame semelhante a um Raio-X, para ver a quantidade de osso) e uma tomografia da sua perna e braço esquerdo para ver a quantidade e qualidade do seu osso;
- Você irá utilizar um aparelho chamado acelerômetro durante quarenta e oito horas durante suas atividades habituais. Este aparelho é uma espécie de cinta de tecido que você vestirá e nela há um pequeno dispositivo (menor que um aparelho celular);
- Você irá respirar em um aparelho que irá avaliar os gases exalados.

3 – Você será orientado a manter dieta rica em cálcio e receberá suplementação de vitamina D, medidas que já sabemos que previnem a osteoporose.

4 – Existem riscos mínimos se você participar do estudo, como sangramentos e manchas roxas no local da coleta de sangue. A quantidade de radiação no exame de densitometria e de tomografia é muito pequena (menor que um exame de RX de tórax). A suplementação de vitamina D pode aumentar o cálcio no sangue e na urina e facilitar o aparecimento de pedra nos rins em pessoas com tendência.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

5 – A partir dos resultados desta pesquisa poderemos conhecer melhor quais as chances dos pacientes transplantados cardíacos terem osteoporose (ossos mais fracos).

6 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o *Prof. Dr. Fernando Bacal* que pode ser encontrado no endereço *Av. Dr. Eneas Carvalho de Aguiar, 44, 2º andar, bloco 1 - CEP: 05403-900, São Paulo-SP Telefone: 11-2661-5482*. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – E-mail: [marcia.carvalho@hc.fm.usp.br](mailto:marcia.carvalho@hc.fm.usp.br)

7 – Você pode suspender a autorização a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

8 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

9 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

10 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

11 – Pedimos o seu consentimento para utilizar os dados e o material coletado (o sangue será guardado a – 80°C, em biorepositório) para a utilização nesta pesquisa e outras pesquisas sobre transplante cardíaco do nosso Grupo (responsável Prof. Dr. Fernando Bacal) nos próximos 10 anos.

*Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?*

*(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar a cada pesquisa futura na qual será utilizado com o meu material.*

*(.....) NÃO. Eu dispenso a autorização futura para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.*

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo *Avaliação da Densidade Óssea e Microarquitetura Óssea em Pacientes Transplantados Cardíacos*.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Eu discuti com o Dr. Luis Fernando B. C. Seguro e/ou Dr. Fernando Bacal sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou responsável legal

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha (para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo

Anexo 2 – Artigo aceito para publicação no *Transplantation*.

Original Clinical Science—General



## Bone Metabolism Impairment in Heart Transplant: Results From a Prospective Cohort Study

AQ1 Luis F.B.C. Seguro, MD,<sup>1</sup> Rosa M.R. Pereira, PhD, MD,<sup>2</sup> Luciana P.C. Seguro, PhD, MD,<sup>2</sup> Valeria F. Caparbo, PhD,<sup>2</sup> Monica S. Avila, PhD, MD,<sup>1</sup> Sandrigo Mangini, PhD, MD,<sup>1</sup> Iascara W. Campos, MD,<sup>1</sup> Fabio A. Galotto, PhD, MD,<sup>1</sup> Fabiana G. Marcondes-Braga, PhD, MD,<sup>1</sup> and Fernando Bacal, PhD, MD<sup>1</sup>

**Background.** Data on the prevention of fractures after heart transplant (HTx) are controversial in the literature. Understanding the effects of HTx on bone may guide appropriate treatments in this high-risk population. **Methods.** Seventy adult HTx patients were followed for 12 months. Clinical and laboratory parameters, bone mineral density, microarchitecture, and vertebral fractures were assessed at baseline (after intensive care unit discharge) and at 6 and 12 months. Patients received recommendations regarding calcium intake and vitamin D supplementation after HTx. **Results.** At baseline, 27% of patients had osteoporosis, associated with the length of hospitalization before HTx ( $P = 0.001$ ). Bone mineral density decreased in the first 6 months, with partial recovery later. Bone microarchitecture deteriorated, mainly in the trabecular bone in the first 6 months and cortical bone in the subsequent 6 months. At baseline, 92.9% of patients had vitamin D levels  $<30$  ng/mL and 20.0%  $<10$  ng/mL. Patients also had calcium at the lower limit of normal, high alkaline phosphatase, and high bone resorption biomarker. These abnormalities were suggestive of impaired bone mineralization and normalized at 6 months with correction of vitamin D deficiency. The majority of vertebral fractures were identified at baseline (23% of patients). After multivariate analyses, only a lower fat mass persisted as a risk factor for vertebral fractures (odds ratio, 1.23; 95% confidence interval, 1.04–1.47;  $P = 0.012$ ). **Conclusions.** High frequencies of densitometric osteoporosis, vitamin D deficiency, bone markers abnormalities, and vertebral fractures were observed shortly after HTx. Calcium and vitamin D supplementation should be the first step in correcting bone mineralization impairment before specific osteoporosis treatment. (*Transplantation* 2019;00: 00–00)

### INTRODUCTION

Heart transplant (HTx) is recognized as the best treatment for refractory heart failure. Improvement in the survival of HTx

Received 11 May 2019. Revision received 1 July 2019.

Accepted 13 July 2019.

<sup>1</sup> Instituto do Coração (InCor), Hospital das Clínicas HCRMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup> Bone Metabolism Laboratory, Rheumatology Division, Hospital das Clínicas HCRMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

L.F.B.C.S. participated in research design, data collection, data analysis, and article preparation. R.M.R.P. participated in research design, data analysis, and article preparation. L.P.C.S. participated in research design, data collection, data analysis, and article preparation. V.F.C. participated in data collection and data analysis. M.S.A. participated in data collection. S.M. participated in data collection. I.W.C. participated in data collection. F.A.G. participated in data collection. F.G.M.B. participated in research design, data collection, and data analysis. F.B. participated in research design, data analysis, and article preparation. All authors approved the final version of the article.

AQ7 The authors declare no conflicts of interest.

This study was not sponsored by any pharmaceutical company. It was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2014/21239-4 to F.G.M.B.) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 305556/2017-7 to R.M.R.P.).

Correspondence: Luis F.B.C. Seguro, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 44 – Núcleo de Transplantes, 2º andar InCor, São Paulo, Brazil 05403-000. (luisseguro@yahoo.com.br)

Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0041-1337/19/0000-0000

DOI: 10.1097/TP.0000000000002906

recipients is accompanied by increases in related comorbidities, including osteoporosis and fragility fractures. In the general population, fragility fractures are associated with higher overall and cardiovascular mortality, and osteoporosis treatment increases survival.<sup>1,3</sup> Although no data are available on the fracture-related mortality risk in HTx patients, fragility fractures may have an impact on patients' daily activities.

Osteoporosis treatment after HTx is controversial. Although previous studies have found that bisphosphonate use can prevent bone mass loss, they did not show consistent results for the prevention of fractures.<sup>4–12</sup> Moreover, some bisphosphonates have been associated with adverse cardiac events, such as hospitalization because of atrial fibrillation.<sup>13,14</sup>

Therefore, better knowledge of the effects of HTx on bone metabolism parameters, bone mass and bone microarchitecture, and identification of patients with higher risk of fractures can help detect those who may benefit from more aggressive therapies for osteoporosis.

The aim of the present study was to evaluate bone metabolism biomarkers, bone mass loss, bone microarchitecture changes, and frequency of vertebral fractures in the first year after HTx.

### MATERIALS AND METHODS

#### Study Population

All adult patients who underwent HTx at the present institution between July 2013 and September 2015 were

evaluated. Those who were discharged from the intensive care unit (ICU) and were able to participate in a baseline evaluation within 60 days after transplant were included in the study. The exclusion criteria were multiple organ transplantation and retransplantation. The local ethics committee approved the study, and written informed consent was obtained from all participants.

Patients were prospectively followed for 1 year and were evaluated at baseline (after ICU discharge) and at 6 (T6) and 12 (T12) months. Patients received dietary recommendations for adequate calcium intake (1000 mg/d) and oral supplementation of vitamin D (50 000 IU/wk for 3 months, followed by 7000 IU/wk) after HTx.<sup>15</sup>

#### Immunosuppression Protocol

Patients received intravenous methylprednisolone intraoperatively and up to the fifth day after HTx, followed by oral prednisone 1 mg/kg/day, tapering to 5 mg by 3 months. Rejection was usually treated with intravenous methylprednisolone. Patients were treated with cyclosporine initially and switched to tacrolimus after acute rejection. Chagas disease patients were initially treated with azathioprine, and all others were treated with mycophenolate.<sup>16</sup>

#### Data Collection

Demographic and clinical characteristics, risk factors for osteoporosis, and medication use were assessed via patient interviews and chart reviews.

#### Laboratory and Bone Metabolism Biomarker Evaluation

Fasting blood samples were collected at baseline, T6, and T12. Serum levels of calcium, phosphorus, alkaline phosphatase (ALP), albumin, and creatinine were determined. Serum levels of procollagen type 1 aminoterminal propeptide (a bone formation marker), carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (CTX, a bone resorption marker), intact parathormone (PTH), and 25-hydroxyvitamin D (25OHD) were analyzed using an automated Roche electrochemiluminescence system (E411, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The following coefficients of variation (CV) were obtained: 2.2% (procollagen type 1 aminoterminal propeptide), 2.5% (CTX), 2.3%–5.1% (PTH), and 1.6%–6.6% (25OHD). Serum sclerostin levels were measured using a commercial ELISA KIT (Biomedica, Vienna, Austria), and the intra and interassay CVs were 5% and 6%, respectively. Assays were performed according to the manufacturers' instructions.

#### Measurement of Areal Bone Mineral Density

Areal bone mineral density (BMD) was measured at baseline, T6, and T12 by dual-energy X-ray absorptiometry using densitometry equipment (Hologic QDR 4,500, Bedford, MA) at lumbar spine (L1–L4), total hip, and femoral neck. BMD measurements were performed by the same experienced technician, based on International Society for Clinical Densitometry recommendations.<sup>17</sup> Osteoporosis was defined as a T-score  $\leq$  2.5.

Individual bone loss was measured using the least significant change, which was calculated as 0.033 g/cm<sup>2</sup> for lumbar spine and 0.039 g/cm<sup>2</sup> for total hip. For each site, differences in the BMD absolute values above the least significant change were considered significant changes.<sup>18,19</sup>

#### Vertebral Fracture Assessment

Images of thoracic and lumbar spines were obtained by dual-energy X-ray absorptiometry at baseline, T6, and T12 by a trained operator using the same densitometry equipment. Vertebral fractures were identified by 2 experienced rheumatologists (R.M.R.P., L.P.C.S.) using the Genant semiquantitative approach.<sup>20,21</sup>

#### Volumetric BMD, Microarchitecture, and Biomechanical Property Analysis by High-Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography

Volumetric BMD, bone microarchitecture, and biomechanical properties were evaluated using a high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT) device (Xtreme CT Scanco Medical AG, Brüttisellen, Switzerland) at the nondominant distal tibia. Scans were performed by a single trained operator according to the manufacturer's instructions, as described elsewhere.<sup>22,23</sup>

The entire volume of interest was automatically separated into cortical and trabecular regions, and the following variables were used in the analyses: (1) trabecular parameters: volumetric BMD, trabecular bone volume fraction, trabecular number, trabecular thickness, and trabecular separation; (2) cortical parameters: cortical volumetric bone mineral density and cortical thickness. In our laboratory, HR-pQCT measurements of the distal tibia had CVs ranging from 0.25% to 1.16% for density and 0.78% to 6.35% for morphometric measurements.<sup>23,24</sup>

Biomechanical properties were analyzed to estimate bone strength using microfinite element models created directly from HR-pQCT images using the software provided by the manufacturer (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Switzerland), as described previously.<sup>23,25</sup> The following parameters were analyzed: stiffness (tissue stiffness), failure load (estimate of maximum supported load), and apparent modulus (indication of tissue elasticity).

#### Assessment of Physical Activities

Assessments of physical activities in daily life were performed at baseline, T6, and T12 using a triaxial accelerometer-based activity monitor (DynaPort, McRoberts BV, The Hague, the Netherlands), which was previously used in studies of chronic obstructive pulmonary disease.<sup>26</sup> In each evaluation, patients were monitored for 48 hours, and the following parameters were determined: sedentary time (percentage of time sitting or lying) and number of steps per day.

#### Statistical Analysis

Categorical variables are reported as frequencies and continuous variables as means  $\pm$  SDs or medians and interquartile ranges (IQRs). Categorical variables were compared using  $\chi^2$ , Fisher exact, or likelihood ratio tests, and continuous variables were compared using Student *t*-test or the Mann-Whitney test. Logistic regression was used to identify variables associated with osteoporosis and vertebral fractures. Variables with  $P < 0.1$  in the univariate analysis were included in a multivariate model with backward stepwise proportional hazard modeling. Comparisons of data from baseline, T6, and T12 were performed using generalized estimating equations with normal distribution

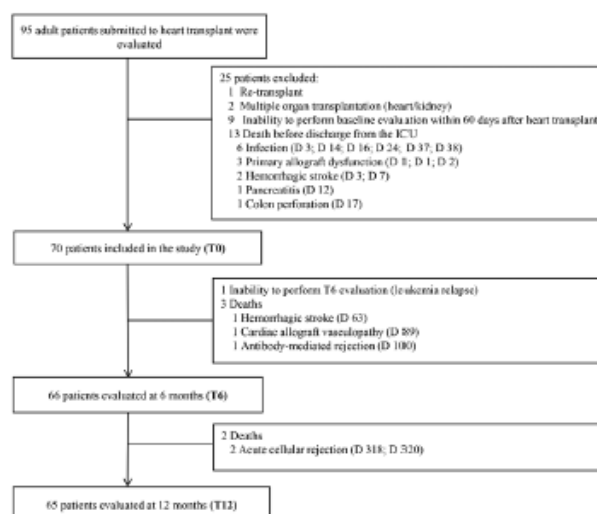


FIGURE 1. Participant flow through the study. ICU, intensive care unit.

and identity link function, assuming that repeated measurements have a first-order autoregressive relationship. A Bonferroni multiple comparisons test was then performed to identify the differences that contributed to significance in generalized estimating equations analysis. The software used was SPSS for Windows, version 20.0 (SPSS, Chicago, IL). Statistical significance was defined as  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Ninety-five patients were evaluated; 1 patient was excluded due to retransplantation, and 2 were excluded due to multiple organ transplantation (heart/kidney). The baseline evaluation could not be performed in 9 patients within 60 days after heart transplantation, and 13 patients died before discharge from the ICU due to infection (6), primary allograft dysfunction (2), hemorrhagic stroke (2), pancreatitis (1), and colon perforation (1). Seventy patients were included in the study, and 5 died during the follow-up period (Figure 1). Patients were discharged from the ICU after 10.0 (IQR, 8.0–16.0) days, and baseline evaluations were performed 22.0 (IQR, 20.0–30.0) days after transplantation. The patient characteristics are shown in Table 1. Of note, 63 (90%) patients had priority status for HTx due to intravenous inotropes or intra-aortic balloon pump dependency. The median length of hospitalization before HTx was 47.5 (IQR, 23.0–77.8) days.

Laboratory parameters at baseline, T6, and T12 are presented in Table 2. At baseline, 92.9% of patients had 25OHD  $<30$  ng/mL, 75.7% had 25OHD  $<20$  ng/mL, and 20.0% had 25OHD  $<10$  ng/mL. Patients had also mean serum levels of calcium at the lower limit of normal ( $8.5 \pm 0.7$  mg/dL; reference range [RR]: 8.5–10.1) and high levels of ALP ( $138.7 \pm 87.5$  U/L, RR: 46–116) and CTX ( $0.79 \pm 0.39$  ng/mL, RR:  $0.299 \pm 0.137$  ng/mL for young men/premenopausal women). These abnormalities were suggestive of impaired bone mineralization, and they

normalized at T6 and T12 with correction of vitamin D deficiency.

High glucocorticoid use (cumulative dose: 4.15 g; IQR, 3.52–5.96) and low physical activity (84.4% took  $<5000$  steps/day) were observed at baseline, with a significant change during the follow-up (Table 2).

Osteoporosis was identified in 27.1% of patients at baseline (Table 3). Patients with osteoporosis had a longer length of hospitalization before HTx than those without osteoporosis: 70.0 (54.0–117) versus 37.0

TABLE 1. Baseline characteristics of the study participants

Characteristic	n = 70
Age (years)	45.5 ± 11.9
Male (n [%])	42 (60)
Weight (kg)	61.6 ± 14.6
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.1 ± 4.5
BMI $<20$ (kg/m <sup>2</sup> ) (n [%])	19 (27.1)
Caucasian (n [%])	39 (55.7)
Cardiac diagnosis (n [%])	
Chagas disease	26 (37.1)
Dilated cardiomyopathy	14 (20.0)
Ischemic cardiomyopathy	9 (12.9)
Other	21 (30.0)
Medical history (n [%])	
Hypertension	12 (17.1)
Diabetes mellitus	11 (15.7)
Smoking	14 (20.0)
Alcohol intake	7 (10.0)
Family history of osteoporosis or fragility fracture	9 (12.9)
Transplant in priority status (n [%])	63 (90)
Length of hospitalization before HTx (days)	47.5 (23.0–77.8)

BMI, body mass index; HTx, heart transplant.



**TABLE 2.** Laboratory parameters, bone turnover markers, glucocorticoid and immunosuppression use, and daily physical activity at baseline and after 6 mo (T6) and 12 mo (T12)

	Baseline	T6	T12	P
<b>Laboratory parameters</b>				
Creatinine (mg/dL)	1.23 ± 0.49	1.44 ± 0.46 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.57 <sup>b</sup>	<0.001
Calcium (mg/dL)	8.5 ± 0.7	9.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	9.2 ± 0.5 <sup>b</sup>	<0.001
Ionized calcium (mg/dL)	1.22 ± 0.06	1.27 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.05 <sup>b</sup>	<0.001
Phosphorus (mg/dL)	3.0 ± 0.8	4.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	<0.001
Albumin (mg/dL)	2.7 ± 0.5	4.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.4 <sup>b</sup>	<0.001
Alkaline phosphatase (U/L)	138.7 ± 87.5	116.0 ± 58.2 <sup>a</sup>	106.3 ± 47.7 <sup>b</sup>	0.006
25-OH-vitamin D (ng/mL)	15.5 ± 9.1	33.8 ± 11.6 <sup>a</sup>	34.7 ± 11.4 <sup>b</sup>	<0.001
PTH (pg/mL)	42.9 ± 27.2	40.1 ± 23.4	44.5 ± 25.1	0.307
<b>Bone turnover markers</b>				
P1NP (00B5g/L)	72.1 ± 37.8	114.8 ± 75.2 <sup>a</sup>	92.1 ± 69.3 <sup>c</sup>	<0.001
CTX (ng/mL)	0.79 ± 0.39	0.59 ± 0.33 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.30 <sup>b</sup>	<0.001
Sclerostin (pmol/L)	25.6 ± 14.7	34.7 ± 16.6 <sup>a</sup>	38.5 ± 21.0 <sup>b</sup>	<0.001
<b>Daily physical activity</b>				
Sedentary time (%)	90.4 (83.2–92.8)	80.3 (75.8–84.6) <sup>a</sup>	83.1 (78.2–85.5) <sup>cb</sup>	<0.001
No. of steps/day	1965 (892–3417)	5923 (3813–8912) <sup>a</sup>	5223 (4047–7071) <sup>cb</sup>	<0.001
<5000 steps/day (n [%])	54 (84.4)	29 (46.8) <sup>a</sup>	27 (46.6) <sup>b</sup>	<0.001
<b>Glucocorticoid use</b>				
Cumulative dose (mg)	4148 (3524–5958)	7993 (5953–9863) <sup>a</sup>	9355 (6885–11 330) <sup>cb</sup>	<0.001
Dose at the time of evaluation, mg/day	40.0 (20.0–50.0)	5.0 (5.0–9.4) <sup>a</sup>	5.0 (2.5–5.0) <sup>b</sup>	<0.001
<b>Immunosuppressive use</b>				
Azathioprine (n [%])	12 (17.1)	8 (12.1)	5 (7.7)	
Mycophenolate (n [%])	56 (80.0)	56 (84.8)	55 (84.6)	
Cyclosporine (n [%])	51 (72.9)	28 (42.4)	23 (35.4)	
Tacrolimus (n [%])	19 (27.1)	37 (56.1)	42 (64.6)	

AQ3 <sup>a</sup>Significant difference between baseline and 6 mo.<sup>b</sup>Significant difference between baseline and 12 mo.<sup>c</sup>Significant difference between 6 and 12 mo.

CTX, carboxy-terminal telopeptide of type I collagen; P1NP, procollagen type 1 aminoterminal propeptide; PTH, parathormone.

**TABLE 3.** Densitometric parameters at baseline and after 6 mo (T6) and 12 mo (T12)

	Baseline	T6	T12	P
Lumbar spine BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.915 ± 0.141	0.897 ± 0.148 <sup>a</sup>	0.911 ± 0.140 <sup>b,c</sup>	<0.001
Lumbar spine T-score ≤ -2.5 (n [%])	17 (24.3)	20 (30.3)	17 (26.2)	0.395
Femoral neck BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.775 ± 0.156	0.739 ± 0.149 <sup>a</sup>	0.742 ± 0.135 <sup>c</sup>	<0.001
Femoral neck T-score ≤ -2.5 (n [%])	7 (10.0)	8 (12.1)	8 (12.3)	0.216
Total hip BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.864 ± 0.155	0.848 ± 0.152 <sup>a</sup>	0.857 ± 0.137 <sup>c</sup>	<0.001
Total hip T-score ≤ -2.5 (n [%])	5 (7.1)	7 (10.6)	4 (6.2)	0.184
Any site T-score ≤ -2.5 (n [%])	19 (27.1)	23 (34.9)	22 (33.9)	0.210

AQ4 <sup>a</sup>Significant difference between baseline and 6 mo.<sup>b</sup>Significant difference between 6 and 12 mo.<sup>c</sup>Significant difference between baseline and 12 mo.

BMD, bone mineral density.

(17.5–70.0) days,  $P = 0.001$ . Each additional day of hospitalization was associated with a 1.3% increase in the risk of osteoporosis (odds ratio, 1.013; 95% confidence interval, 1.002–1.023;  $P = 0.001$ ). There was no significant difference in the frequency of osteoporosis between men and women (23.8 versus 32.1%,  $P = 0.584$ ). No association was found between BMD values and age, race, weight, comorbidities, or bone metabolism laboratory parameters ( $P > 0.05$ ). The prevalence rates of osteoporosis after 6 and 12 months were 34.9% and 33.9%, respectively.

The mean BMD decreased in the first 6 months, with partial recovery later (Table 3). The significant BMD variations between baseline and 6 months and between 6 and 12 months are shown in Figure 2. Most of the patients (56.1%) experienced bone mass loss in the first 6 months at any site (43.9% at total hip and 33.3% at lumbar spine). In the subsequent 6 months, most of the patients remained stable (40.6%) or gained bone mass (35.9%). No association was found between bone mass loss and age, sex, race, comorbidities, bone metabolism laboratory parameters, or glucocorticoid dose ( $P > 0.05$ ).

P2

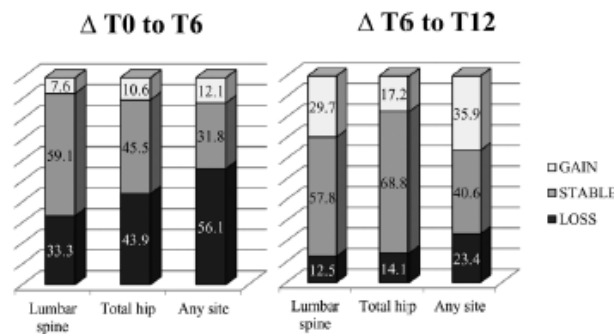


FIGURE 2. Bone mass variations between baseline and 6 mo ( $\Delta T0$  to  $T6$ ) and between 6 and 12 mo ( $\Delta T6$  to  $T12$ ).

**TABLE 4.** HR-pQCT parameters at baseline ( $T0$ ) and the mean individual differences in parameters between baseline and 6 mo ( $\Delta T6-T0$ ) and between 6 and 12 mo ( $\Delta T12-T6$ ) at the tibia

	Baseline	$\Delta T6-T0$	$\Delta(\%) T6-T0$	P	$\Delta T12-T6$	$\Delta(\%) T12-T6$	P	
<b>Trabecular parameters</b>								
AQ5	Tb.vBMD, mg HA/cm <sup>3</sup>	157.0 ± 45.0	-4.54 ± 0.09	-2.89	<0.001	-2.10 ± 0.09	-1.34	<0.001
	BV/TV	0.131 ± 0.037	-0.00377 ± 0.00007	-2.88	<0.001	-0.00176 ± 0.00008	-1.34	<0.001
	Tb.N, 1/mm	1.79 ± 0.41	-0.0697 ± 0.02346	-3.89	0.009	0.00181 ± 0.00004	0.10	>0.999
	Tb.Th, mm	0.074 ± 0.017	0.00027 ± 0.00003	0.36	<0.001	-0.00181 ± 0.00004	-2.45	<0.001
	Tb.Sp, mm	0.520 ± 0.159	0.030 ± 0.006	5.77	<0.001	-0.009 ± 0.007	-1.73	0.53
<b>Cortical parameters</b>								
	Cl.vBMD, mg HA/cm <sup>3</sup>	907.0 ± 71.3	2.30 ± 3.20	0.25	>0.999	-8.68 ± 3.48	-0.96	0.038
	Cl.Th, mm	1.21 ± 0.29	-0.0163 ± 0.00055	-1.35	<0.001	-0.02 ± 0.0006	-1.65	<0.001
<b>Biomechanical properties</b>								
	Stiffness, N/mm	222735 ± 63265	-2021 ± 119	-0.91	<0.001	-4617 ± 133	-2.07	<0.001
	Failure load, N	10604 ± 2942	-114 ± 5	-1.08	<0.001	-208 ± 6	-1.96	<0.001
	Apparent modulus, N/mm <sup>2</sup>	2380 ± 511	-21 ± 1	-0.88	<0.001	-28 ± 1	-1.18	<0.001

$\Delta$ , mean individual difference;  $\Delta(\%)$ , percent change in mean individual difference; BV/TV, trabecular bone volume fraction; Cl.Th, cortical thickness; Cl.vBMD, cortical volumetric bone mineral density; HR-pQCT, high-resolution peripheral quantitative computed tomography; Tb.N, trabecular number; Tb.Sp, trabecular separation; Tb.Th, trabecular thickness; Tb.vBMD, trabecular volumetric bone mineral density.

HR-pQCT analysis at the tibia showed that micro-architectural bone parameters at baseline were associated with osteoporosis. Patients with osteoporosis had lower trabecular volumetric BMD ( $128.18 \pm 51.88$  versus  $168.18 \pm 36.84$  mg HA/cm<sup>3</sup>,  $P = 0.005$ ), BV/TV ( $0.107 \pm 0.04$  versus  $0.140 \pm 0.03$ ,  $P = 0.005$ ) and trabecular number ( $1.51 \pm 0.41$  versus  $1.89 \pm 0.35$  1/mm,  $P < 0.001$ ), greater trabecular separation ( $0.645 \pm 0.212$  versus  $0.472 \pm 0.098$  mm,  $P = 0.002$ ), and decreased cortical thickness ( $1.08 \pm 0.33$  versus  $1.26 \pm 0.26$  mm,  $P = 0.018$ ) compared with patients without osteoporosis. Regarding the estimated biomechanical properties, patients with osteoporosis had lower stiffness ( $188\,112 \pm 63\,960$  versus  $236\,732 \pm 57\,692$  N/mm,  $P = 0.004$ ), failure load ( $8932 \pm 2966$  versus  $11\,279 \pm 2677$  N,  $P = 0.003$ ) and apparent modulus ( $2172 \pm 555$  versus  $2463 \pm 474$  N/mm<sup>2</sup>,  $P = 0.035$ ) values.

T4 Evolutive HR-pQCT analysis (Table 4) showed that in the first 6 months, patients had more prominent impairment of trabecular bone. In the subsequent 6 months, patients showed continuous, less intense deterioration of trabecular bone, and more pronounced deterioration of cortical bone. The estimated biomechanical properties also deteriorated during the follow-up, with reductions in

stiffness, failure load, and apparent modulus at T6 compared with those at baseline and at T12 compared with those at T6 ( $P < 0.001$ ).

Vertebral fractures were found in 16 (23%) patients at baseline. Patients with vertebral fractures had a lower fat mass than those without fractures ( $9.48 \pm 3.42$  versus  $15.13 \pm 6.80$  kg,  $P < 0.001$ ); among them, 87.5% (14/16) were men, and 12.5% (2/16) were women ( $P = 0.011$ ). No association was found between vertebral fractures and other clinical, laboratory or bone metabolism markers, BMD, or HR-pQCT parameters ( $P > 0.05$ ). After multivariate analyses, only a lower fat mass persisted as a risk factor for vertebral fractures (odds ratio, 1.23; 95% confidence interval, 1.04-1.47;  $P = 0.012$ ). During the follow-up period, 3 more patients had a vertebral fracture at T6, and 1 more patient had a vertebral fracture at T12; all cases were grade 1 fractures. Vertebral fractures were found in 18 (28%) patients evaluated at T12.

**DISCUSSION**

To our knowledge, this is the first study to longitudinally perform a thorough assessment of BMD, bone

microarchitecture, and metabolism parameters, including bone turnover variables, in HTx recipients during the first year posttransplant. The main findings of our study were a high prevalence of densitometric osteoporosis, vitamin D deficiency, bone markers abnormalities, and vertebral fractures at baseline evaluation. These biochemical and bone turnover markers normalized with correction of vitamin D deficiency, suggesting the presence of osteomalacia/mineralization defect.

A noteworthy characteristic of the study population was that 90% of patients were hospitalized at the time of HTx and had a long length of hospitalization before transplantation (47.5 days), which can be explained by the unavailability of long-term assist devices as bridges for transplants at our institution. Our results are in contrast with data from the International Society for Heart and Lung Transplantation; half of the patients in this registry were on left ventricular-assist device support, and 44.4% of recipients were hospitalized at the time of transplant.<sup>27</sup> Indeed, the high prevalence of osteoporosis at baseline (27%) observed in the present sample was associated with the length of hospitalization before HTx. Advanced heart failure, hospitalization, nutritional deficits, low sun exposure, systemic inflammation, lack of physical activity, and hormonal disorders may have contributed to this finding.<sup>28</sup>

Our data regarding biochemical bone markers at baseline (calcium at the lower limit of normal, a mean 25OHD level of 15 ng/mL, high ALP, and high CTX) suggested bone mineralization impairment due to vitamin D/calcium deficiency, which was corrected with vitamin D supplementation and a calcium-rich diet. These recommendations should be made before introducing bone-active drugs because bisphosphonate therapy in vitamin D/calcium-deficient patients may be less effective and may exacerbate bone mineralization defect/osteomalacia.<sup>29-31</sup> Carmel et al<sup>32</sup> showed that in postmenopausal women with osteoporosis, those with serum 25OHD levels  $\geq 33$  ng/mL had a 4.5-fold greater likelihood of a favorable response to bisphosphonate, whereas a 1-ng/mL decrease in serum 25OHD levels was associated with a 5% decrease in the odds of responding. In fact, bisphosphonates reduce bone turnover and increase secondary mineralization of bone, which is hampered in patients with vitamin D deficiency.<sup>31</sup> This is a matter of greater importance because vitamin D insufficiency is highly prevalent in HTx recipients (92.9% in the present sample and up to 90% in the literature).<sup>33</sup>

Bone mass loss and fragility fractures are important complications after HTx. Previous studies have shown that rapid bone loss occurs most often in the first year after transplantation.<sup>4,34-41</sup> In our study, BMD loss occurred mainly during the first 6 months after HTx, whereas in the subsequent 6 months, most patients remained stable or gained bone mass. Interestingly, microarchitecture evaluation using HR-pQCT revealed continuous bone loss over the 1-year follow-up period, with greater impacts on trabecular bone in the first 6 months and on cortical bone in the subsequent 6 months.

In our study, 28% of patients had vertebral fractures after HTx, similar to previous data reported in the literature (21%–44%).<sup>34,35</sup> Surprisingly, we demonstrate that most vertebral fractures were present at the first evaluation after transplantation, corresponding to 23% of patients. In

fact, the peritransplant period is associated with a higher risk of fractures due to the deleterious effects of advanced heart failure and consequent poor pretransplant clinical status of bone, as well as the high glucocorticoid doses immediately after HTx, which may have an even greater impact in the context of calcium and vitamin D deficiency. In the study, vertebral fractures were associated with a lower fat mass. In this regard, a low body weight has been well documented as a risk factor for fragility fractures, whereas a lower fat mass is a risk factor for hip and osteoporotic fractures but is not independent of the BMD and Fracture Risk Assessment Tool probability.<sup>42,43</sup> Moreover, a low weight and fat mass could be signs of frailty syndrome, found in up to 74% of patients with advanced heart failure.<sup>44</sup>

In terms of osteoporosis treatment, concerns exist regarding the safety of bisphosphonates after HTx. Randomized controlled trials and observational studies suggest a significant increase in the risk of atrial fibrillation requiring hospitalization with bisphosphonate use in the general population, especially parenteral drugs.<sup>45,46</sup> Studies of bisphosphonates in HTx patients showed no serious adverse events, but the sample size is limited.<sup>4</sup> Low serum levels of calcium, secondary to low calcium intake or vitamin D deficiency, may increase the risk of adverse cardiovascular events with the use of bisphosphonate in this population.

Previous studies have shown that bisphosphonates (alendronate, ibandronate, pamidronate, etidronate, risedronate, clodronate, zoledronate) prevent bone mass loss after HTx, especially in the lumbar spine, but the results on the prevention of fractures are controversial.<sup>4,12</sup> Our finding of bone mineralization impairment due to vitamin D/calcium deficiency may explain, at least in part, the inefficacy of bisphosphonates in preventing fractures after HTx. One study evaluating 149 HTx recipients treated with either alendronate or calcitriol for 1 year found no differences in the fracture rates between the groups.<sup>5</sup> Interestingly, the vitamin D level was not evaluated, but the PTH level was decreased in the calcitriol group (from  $44 \pm 5$  to  $29 \pm 5$  pg/mL) and increased in the alendronate group (from  $39 \pm 4$  to  $51 \pm 4$  pg/mL) at the 6-month evaluation ( $P < 0.001$ ).<sup>5</sup> These alterations in the PTH level may reflect vitamin D insufficiency and bone mineralization impairment. Similarly, another study with 48 HTx recipients evaluated etidronate versus alfacalcidol, both associated with calcium carbonate. There were fewer vertebral fractures in the alfacalcidol group than in the etidronate group (2 versus 8 new vertebral fractures).<sup>47</sup> The baseline 25OHD levels were  $13.0 \pm 7.5$  and  $12.5 \pm 4.4$  ng/mL, respectively.<sup>47</sup>

The limitations of the study include the limited sample size and the fact that it was performed at a single center where long-term assist devices are not available. Furthermore, pretransplant data were not available because most patients underwent their first evaluation for HTx while hospitalized for acute decompensated heart failure and without clinical conditions for BMD and bone microarchitecture measurements. It is also important to consider that our findings could be related to the characteristics of our population, namely the high frequency of a low BMI, the long duration of hospitalization before HTx, and the high mortality rate after HTx, which suggest a frail population.

AQ6

In conclusion, high frequencies of densitometric osteoporosis, vitamin D deficiency, bone marker abnormalities, and vertebral fractures were found shortly after HTx. Of note, vitamin D deficiency is highly prevalent in HTx patients and can contribute to an increased fracture risk due to mineralization defect. Consequently, calcium and vitamin D supplementation should be the first step in correcting bone mineralization impairment before specific osteoporosis treatments. Further studies are necessary to determine the right time to introduce bone-active drugs. Special attention should be given to patients with a long hospitalization duration before HTx and a low-fat mass.

## REFERENCES

- Tran T, Bliuc D, Hansen L, et al. Persistence of excess mortality following individual nonhip fractures: a relative survival analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(9):3205–3214.
- Farhat GN, Cauley JA. The link between osteoporosis and cardiovascular disease. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2008;5(1):19–34.
- Kranenburg G, Barstra JW, Weijmans M, et al. Bisphosphonates for cardiovascular risk reduction: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2016;252:106–115.
- Zhao J, Wang C, Hu Z. Efficacy and safety of bisphosphonates for osteoporosis or osteopenia in cardiac transplant patients: a meta-analysis. *Transplant Proc*. 2015;47(10):2957–2964.
- Shane E, Adesio V, Namerow PB, et al. Alendronate versus calcitriol for the prevention of bone loss after cardiac transplantation. *N Engl J Med*. 2004;350(8):767–776.
- Gilfrugas L, Guadalupe S, Martinez G, et al. Bone loss after heart transplant: effect of alendronate, etidronate, calcitonin, and calcium plus vitamin D3. *Prog Transplant*. 2012;22(3):237–243.
- Fahrleitner-Pammer A, Pitswanger-Soelkner JC, Pieber TR, et al. Ibendronate prevents bone loss and reduces vertebral fracture risk in male cardiac transplant patients: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res*. 2009;24(7):1335–1344.
- Shane E, Rodino MA, McMahon DJ, et al. Prevention of bone loss after heart transplantation with antiresorptive therapy: a pilot study. *J Heart Lung Transplant*. 1998;17(11):1089–1096.
- Henderson K, Eisman J, Keogh A, et al. Protective effect of short-term calcitriol or cyclical etidronate on bone loss after cardiac or lung transplantation. *J Bone Miner Res*. 2001;16(3):565–571.
- Lange U, Classen K, Müller-Ladner U, Richter M. Weekly oral bisphosphonates over 2 years prevent bone loss in cardiac transplant patients. *Clin Transplant*. 2017;31(11).
- Ippoliti G, Pellegrini C, Campana C, et al. Clodronate treatment of established bone loss in cardiac recipients: a randomized study. *Transplantation*. 2003;75(3):330–334.
- Shane E, Cohen A, Stein EM, et al. Zoledronic acid versus alendronate for the prevention of bone loss after heart or liver transplantation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(12):4481–4490.
- Wang JC, Chien WC, Chung CH, et al. Adverse cardiovascular effects of nitrogen-containing bisphosphonates in patients with osteoporosis: A nationwide population-based retrospective study. *Int J Cardiol*. 2016;215:232–237.
- Kim DH, Rogers JR, Fulchino LA, et al. Bisphosphonates and risk of cardiovascular events: a meta-analysis. *Plos One*. 2015;10(4):e0122646.
- Pludowski P, Karczmarewicz E, Bayer M, et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in central Europe - recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. *Endokrynol Pol*. 2013;64(4):319–327.
- Bacal F, Marcondes-Braga FG, Rohde LEP, et al. *Arq Bras Cardiol*. 2018;111(2):230–289.
- Lewicki EM, Gordon CM, Baim S, et al. International Society For Clinical Densitometry 2007 adult and pediatric official positions. *Bone*. 2008;43(6):1115–1121.
- El Maghraoui A, Achemil L, Bezza A. Monitoring of dual-energy X-ray absorptiometry measurement in clinical practice. *J Clin Densitom*. 2006;9(3):281–286.
- Baim S, Wilson CR, Lewicki EM, et al. Precision assessment and radiation safety for dual-energy X-ray absorptiometry: position paper of the international society for clinical densitometry. *J Clin Densitom*. 2005;8(4):371–378.
- Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, et al. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res*. 1993;8(9):1137–1148.
- Domiciano DS, Figueiredo CP, Lopes JB, et al. Vertebral fracture assessment by dual X-ray absorptiometry: a valid tool to detect vertebral fractures in community-dwelling older adults in a population-based survey. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013;65(5):809–815.
- Vilaythiou N, Boutroy S, Sornay-Rendu E, et al. Age-related changes in bone strength from HR-pQCT derived microarchitectural parameters with an emphasis on the role of cortical porosity. *Bone*. 2016;83:233–240.
- Alvarenga JC, Fuller H, Pasoto SG, et al. Age-related reference curves of volumetric bone density, structure, and biomechanical parameters adjusted for weight and height in a population of healthy women: an HR-pQCT study. *Osteoporos Int*. 2017;28(4):1335–1346.
- Paupitz JA, Lima GL, Alvarenga JC, et al. Bone impairment assessed by HR-pQCT in juvenile-onset systemic lupus erythematosus. *Osteoporos Int*. 2016;27(5):1839–1848.
- van Rietbergen B, Weinans H, Huiskes R, et al. A new method to determine trabecular bone elastic properties and loading using micro-mechanical finite-element models. *J Biomech*. 1995;28(1):69–81.
- Jehn M, Schindler C, Meyer A, et al. Daily walking intensity as a predictor of quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(7):1212–1218.
- Khush KK, Cherikh WS, Chambers DC, et al; International Society for Heart and Lung Transplantation. The international thoracic organ transplant registry of the international society for heart and lung transplantation: thirty-fifth adult heart transplantation report-2018; focus theme: multiorgan transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2018;37(10):1155–1168.
- Wang TK, O'Sullivan S, Gamble GD, et al. Bone density in heart or lung transplant recipients—a longitudinal study. *Transplant Proc*. 2013;45(6):2357–2365.
- Koster JC, Hackeng WH, Mulder H. Diminished effect of etidronate in vitamin D deficient osteopenic postmenopausal women. *Eur J Clin Pharmacol*. 1996;51(2):145–147.
- Wimalawansa SJ. Combined therapy with estrogen and etidronate has an additive effect on bone mineral density in the hip and vertebrae: four-year randomized study. *Am J Med*. 1995;99(1):36–42.
- Lems WF, Geusens P. Are bisphosphonates effective and safe in patients with low serum vitamin D levels? *Int J Clin Rheumatol*. 2009;4:119–121.
- Carmel AS, Shieh A, Bang H, et al. The 25(OH)D level needed to maintain a favorable bisphosphonate response is >33 ng/ml. *Osteoporos Int*. 2012;23(10):2479–2487.
- Stein EM, Cohen A, Freeby M, et al. Severe vitamin D deficiency among heart and liver transplant recipients. *Clin Transplant*. 2009;23(6):861–865.
- Lan GB, Xie XB, Peng LK, et al. Current status of research on osteoporosis after solid organ transplantation: pathogenesis and management. *Biomed Res Int*. 2015;2015:413169.
- Leidig-Bruckner G, Hosch S, Dodidou P, et al. Frequency and predictors of osteoporotic fractures after cardiac or liver transplantation: a follow-up study. *Lancet*. 2001;357(9253):342–347.
- Shane E, Rivas M, McMahon DJ, et al. Bone loss and turnover after cardiac transplantation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(5):1497–1506.
- Shane E, Rivas MC, Silverberg SJ, et al. Osteoporosis after cardiac transplantation. *Am J Med*. 1993;94(3):257–264.
- Henderson NK, Sambrook PN, Kelly PJ, et al. Bone mineral loss and recovery after cardiac transplantation. *Lancet*. 1995;346(8979):905.
- Sambrook PN, Kelly PJ, Keogh AM, et al. Bone loss after heart transplantation: a prospective study. *J Heart Lung Transplant*. 1994;13(1 Pt 1):116–20; discussion 11.
- Thiébaud D, Krieg MA, Gillard-Berguer D, et al. Cyclosporine induces high bone turnover and may contribute to bone loss after heart transplantation. *Eur J Clin Invest*. 1996;26(7):549–555.
- Van Cleemput J, Daenen W, Nijs J, et al. Timing and quantification of bone loss in cardiac transplant recipients. *Transpl Int*. 1995;8(3):196–200.
- Hars M, Trombetti A. Body composition assessment in the prediction of osteoporotic fractures. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29(4):394–401.
- Leslie WD, Orwoll ES, Nielson CM, et al. Estimated lean mass and fat mass differentially affect femoral bone density and strength index but are not FRAX independent risk factors for fracture. *J Bone Miner Res*. 2014;29(11):2511–2519.

44. Uchmanowicz I, Mlynarska A, Lisiak M, et al. Heart failure and problems with frailty syndrome: why it is time to care about frailty syndrome in heart failure. *Card Fail Rev.* 2019;5(1):37-43.
45. Sharma A, Chatterjee S, Arbab-Zadeh A, et al. Risk of serious atrial fibrillation and stroke with use of bisphosphonates: evidence from a meta-analysis. *Chest.* 2013;144(4):1311-1322.
46. Sharma A, Einstein AJ, Vallakati A, et al. Risk of atrial fibrillation with use of oral and intravenous bisphosphonates. *Am J Cardiol.* 2014;113(11):1815-1821.
47. Van Cleemput J, Daenen W, Geusens P, et al. Prevention of bone loss in cardiac transplant recipients. A comparison of biphosphonates and vitamin D. *Transplantation.* 1996;61(10):1495-1499.

### Anexo 3 – Prêmio

- Melhor trabalho na categoria pôster no 25º Encontro de Reumatologia Avançada, realizado de 23 a 25 de maio de 2019, São Paulo.



## **8 Referências**

---

## 8. REFERÊNCIAS

1. Tran T, Bliuc D, Hansen L, Abrahamsen B, van den Bergh J, Eisman JA et al. Persistence of Excess Mortality Following Individual Nonhip Fractures: A Relative Survival Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:3205-14.
2. Bliuc D, Nguyen ND, Milch VE, Nguyen TV, Eisman JA, Center JR. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *JAMA*. 2009 Feb 4;301(5):513-21.
3. Farhat GN, Cauley JA. The link between osteoporosis and cardiovascular disease. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2008;5:19-34.
4. Lyles KW, Colón-Emeric CS, Magaziner JS, Adachi JD, Pieper CF, Mautalen C, et al. HORIZON Recurrent Fracture Trial. Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *N Engl J Med*. 2007 Nov 1;357(18):1799-809.
5. Kranenburg G, Bartstra JW, Weijmans M, et al. Bisphosphonates for cardiovascular risk reduction: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2016 Sep;252:106-15.
6. Shane E, Rodino MA, McMahon DJ, Addesso V, Staron RB, Seibel MJ, et al. Prevention of bone loss after heart transplantation with antiresorptive therapy: a pilot study. *J Heart Lung Transplant* 1998;17:1089-96.



7. Henderson K, Eisman J, Keogh A, MacDonald P, Glanville A, Spratt P, et al. Protective effect of short-term calcitriol or cyclical etidronate on bone loss after cardiac or lung transplantation. *J Bone Miner Res* 2001;16:565-71.
8. Ippoliti G, Pellegrini C, Campana C, Rinaldi M, D'Armini A, Goggi C, et al. Clodronate treatment of established bone loss in cardiac recipients: a randomized study. *Transplantation* 2003;75:330-4.
9. Shane E, Addezzo V, Namerow PB, McMahon DJ, Lo SH, Staron RB, et al. Alendronate versus calcitriol for the prevention of bone loss after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 2004;350:767-76.
10. Fahrleitner-Pammer A, Piswanger-Soelkner JC, Pieber TR, Obermayer-Pietsch BM, Pilz S, Dimai HP, et al. Ibandronate prevents bone loss and reduces vertebral fracture risk in male cardiac transplant patients: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res* 2009;24:1335-44.
11. Gilfraguas L, Guadalix S, Martinez G, Jodar E, Vara J, Gomez-Sanchez MA, et al. Bone loss after heart transplant: effect of alendronate, etidronate, calcitonin, and calcium plus vitamin D3. *Prog Transplant* 2012;22:237-43.
12. Shane E, Cohen A, Stein EM, McMahon DJ, Zhang C, Young P, et al. Zoledronic acid versus alendronate for the prevention of bone loss after heart or liver transplantation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Dec;97(12):4481-90.

13. Zhao J, Wang C, Hu Z. Efficacy and Safety of Bisphosphonates for Osteoporosis or Osteopenia in Cardiac Transplant Patients: A Meta-Analysis. *Transplant Proc* 2015;47:2957-64.
14. Wang JC, Chien WC, Chung CH, Liao WI, Tsai SH. Adverse cardiovascular effects of nitrogen-containing bisphosphonates in patients with osteoporosis: A nationwide population-based retrospective study. *Int J Cardiol* 2016;215:232-7.
15. Kim DH, Rogers JR, Fulchino LA, Kim CA, Solomon DH, Kim SC. Bisphosphonates and risk of cardiovascular events: a meta-analysis. *PLoS One* 2015;10:e0122646.
16. Rohde LEP, Montera MW, Bocchi EA, Clausell NO, Albuquerque DC, Rassi S, et al. Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica e Aguda. *Arq Bras Cardiol.* 2018 Sep;111(3):436-539.
17. Bacal F, Marcondes-Braga FG, Rohde LEP, Xavier Júnior JL, Brito FS, Moura LAZ, et al. 3ª Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. *Arq Bras Cardiol.* 2018;111(2):230-89.
18. Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, Anderson A, Chan M, Desai S, et al. International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines: the International Society for Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2010;11(8):914–56.
19. Radominski SC, Bernardo W, Paula AP, Albergariad B, Moreira C, Fernandes CE, et al. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e

- tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras Reumatol.* 2017;57(S2):S452–S466.
20. Loures MAR, Zerbini CAF, Danowski JS, Pereira RMR, Moreira C, Paula AP, et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Reumatologia para diagnóstico e tratamento da osteoporose em homens. *Rev Bras Reumatol.* 2017;57(S2):S497–S514.
21. Wang TKM, O’Sullivan S, Gamble GD, Ruygrok PN. Bone density in heart or lung transplant recipients - a longitudinal study. *Transplant Proc.* 2013 Jul-Aug;45(6):2357-65.
22. Dolgos S, Hartmann A, Isaksen GA, Simonsen S, Bjørtuft Ø, Boberg KM, Bollerslev J. Osteoporosis is a prevalent finding in patients with solid organ failure awaiting transplantation—a population based study. *Clin Transplant.* 2010 Sep-Oct;24(5):E145-52.
23. Stein E, Ebeling P, Shane E. Post-transplantation osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007;36:937–63.
24. Lan GB, Xie XB, Peng LK, Liu L, Song L, Dai HL. Current Status of Research on Osteoporosis after Solid Organ Transplantation: Pathogenesis and Management. *Biomed Res Int.* 2015;2015:413169.
25. Dalle Carbonare L, Zanatta M, Braga V, Sella S, Vilei MT, Feltrin G, et al. Densitometric threshold and vertebral fractures in heart transplant patients. *Transplantation.* 2011 Jul 15;92(1):106-11.
26. Leidig-Bruckner G, Hosch S, Dodidou P, Ritschel D, Conradt C, Klose C, et al. Frequency and predictors of osteoporotic fractures after

- cardiac or liver transplantation: a follow-up study. *Lancet*. 2001 Feb 3;357(9253):342-7.
27. Löfdahl E, Rådegran G. Osteoporosis following heart transplantation and immunosuppressive therapy. *Transplant Rev (Orlando)*. 2017 Oct;31(4):232-9.
28. Opelz G, Döhler B, Laux G; Collaborative Transplant Study. Long-term prospective study of steroid withdrawal in kidney and heart transplant recipients. *Am J Transplant*. 2005 Apr;5(4 Pt 1):720-8.
29. Teuteberg JJ, Shullo M, Zomak R, McNamara D, McCurry K, Kormos RL. Aggressive steroid weaning after cardiac transplantation is possible without the additional risk of significant rejection. *Clin Transplant*. 2008;22(6):730-7.
30. Compston J. Management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Feb;6(2):82-8.
31. Kulak CA, Borba VZ, Kulak J Jr, Custódio MR. Osteoporosis after transplantation. *Curr Osteoporos Rep*. 2012 Mar;10(1):48-55.
32. Pereira RM, Carvalho JF, Paula AP, Zerbini C, Domiciano DS, Gonçalves H, et al; Committee for Osteoporosis and Bone Metabolic Disorders of the Brazilian Society of Rheumatology; Brazilian Medical Association; Brazilian Association of Physical Medicine and Rehabilitation. Guidelines for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rev Bras Reumatol* 2012;52:580-93.

- 
33. Lekamwasam S, Adachi JD, Agnusdei D, Bilezikian J, Boonen S, Borgström F, et al; Joint IOF-ECTS GIO Guidelines Working Group. A framework for the development of guidelines for the management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Osteoporos Int* 2012;23:2257-76.
34. Buckley L, Guyatt G, Fink HA, Cannon M, Grossman J, Hansen KE, et al. 2017 American College of Rheumatology Guideline for the Prevention and Treatment of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017 Aug;69(8):1095-110.
35. Crespo-Leiro M. Calcineurin inhibitors in heart transplantation. *Transplant Proc*. 2005; 37 (9): 4018-20.
36. McIntyre HD, Menzies B, Rigby R, Perry-Keene DA, Hawley CM, Hardie IR. Long-term bone loss after renal transplantation: comparison of immunosuppressive regimens. *Clin Transplant*. 1995;9(1):20–4.
37. Monegal A, Navasa M, Guanabens N, Peris P, Pons F, Martinez de Osaba MJ, et al. Bone mass and mineral metabolism in liver transplant patients treated with FK506 or cyclosporine A. *Calcif Tissue Int*. 2001;68(2):83–6.
38. Goffin E, Devogelaer JP, Lalaoui A, Depresseux G, De Naeyer P, Squifflet JP, et al. Tacrolimus and low-dose steroid immunosuppression preserves bone mass after renal transplantation. *Transpl Int*. 2002;15(2–3):73–80.
39. Marcén R, Caballero C, Pascual J, Teruel JL, Tenorio M, Ocaña J, et al. Lumbar bone mineral density in renal transplant patients on neoral

- and tacrolimus: a four-year prospective study. *Transplantation*. 2006 Mar 27;81(6):826-31.
40. Stein EM, Cohen A, Freeby M, Rogers H, Kokolus S, Scott V, et al. Severe vitamin D deficiency among heart and liver transplant recipients. *Clin Transplant* 2009;23:861-5.
41. Stein EM, Shane E. Vitamin D in organ transplantation. *Osteoporos Int*. 2011 Jul;22(7):2107-18.
42. Zittermann A, Schleithoff SS, Götting C, Fuchs U, Kuhn J, Kleesiek K, et al. Calcitriol deficiency and 1-year mortality in cardiac transplant recipients. *Transplantation*. 2009 Jan 15;87(1):118-24.
43. Laib A, Rügsegger P. Comparison of structure extraction methods for in vivo trabecular bone measurements. *Comput Med Imaging Graph*. 1999 Mar-Apr;23(2):69-74.
44. Burrows M, Liu D, McKay H. High-resolution peripheral QCT imaging of bone micro-structure in adolescents. *Osteoporos Int*. 2010 Mar;21(3):515-20.
45. Fuller H, Fuller R, Pereira RMR. High resolution peripheral quantitative computed tomography for the assessment of morphological and mechanical bone parameters. *Rev Bras Reumatol*. 2015;55(4):352-62.
46. Black DM, Thompson DE. The effect of alendronate therapy on osteoporotic fracture in the vertebral fracture arm of the Fracture Intervention Trial. *Int J Clin Pract Suppl*. 1999 Apr;101:46-50.
47. Black DM. The role of clinical risk factors in the prediction of future risk. *J Clin Densitom*. 1999 Winter;2(4):361-2.

- 
48. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med.* 2006 May 25;354(21):2250-61.
49. Link TM. High-resolution magnetic resonance imaging to assess trabecular bone structure in patients after transplantation: a review. *Top Magn Reson Imaging.* 2002 Oct;13(5):365-75.
50. Anijar JR, Szejnfeld VL, Almeida DR, Fernandes AR, Ferraz MB. Reduced bone mineral density in men after heart transplantation. *Braz J Med Biol Res.* 1999 Apr;32(4):413-20.
51. Sharma A, Chatterjee S, Arbab-Zadeh A, Goyal S, Lichstein E, Ghosh J, et al. Risk of serious atrial fibrillation and stroke with use of bisphosphonates: evidence from a meta-analysis. *Chest.* 2013;144(4):1311-22.
52. Sharma A, Einstein AJ, Vallakati A, Arbab-Zadeh A, Walker MD, Mukherjee D, et al. Risk of atrial fibrillation with use of oral and intravenous bisphosphonates. *Am J Cardiol.* 2014;113(11):1815-21.
53. Shrosbree JE, Elder GJ, Eisman JA, Center JR. Acute hypocalcaemia following denosumab in heart and lung transplant patients with osteoporosis. *Intern Med J.* 2018 Jun;48(6):681-7.
54. Garcia-Delgado I, Prieto S, Gil-Fraguas L, Robles E, Rufilanchas JJ, Hawkins F. Calcitonin, etidronate, and calcidiol treatment in bone loss after cardiac transplantation. *Calcif Tissue Int.* 1997 Feb;60(2):155-9.
55. Van Cleemput J, Daenen W, Geusens P, Dequeker P, Van De Werf F, VanHaecke J. Prevention of bone loss in cardiac transplant recipients.

- A comparison of bisphosphonates and vitamin D. *Transplantation* 1996;61:1495-9.
56. Lemire JM. Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995 Jun;53(1-6):599-602.
57. Bikle DD. Vitamin D and the immune system: role in protection against bacterial infection. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008 Jul;17(4):348-52.
58. Hullett DA, Cantorna MT, Redaelli C, Humpal-Winter J, Hayes CE, Sollinger HW, et al. Prolongation of allograft survival by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Transplantation*. 1998 Oct 15;66(7):824-8.
59. Briffa NK, Keogh AM, Sambrook PN, Eisman JA. Reduction of immunosuppressant therapy requirement in heart transplantation by calcitriol. *Transplantation*. 2003 Jun 27;75(12):2133-4.
60. Sousa IO, Diniz ET, Marques TF, Griz L, Coutinho Mde A, Bandeira F. Short-term bone marker responses to teriparatide and strontium ranelate in patients with osteoporosis previously treated with bisphosphonates. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010 Mar;54(2):244-9.
61. Mödder UI, Hoey KA, Amin S, McCready LK, Achenbach SJ, Riggs BL, et al. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *J Bone Miner Res*. 2011 Feb;26(2):373-9.
62. Lewiecki EM, Gordon CM, Baim S, Leonard MB, Bishop NJ, Bianchi ML, et al. International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult and Pediatric Official Positions. *Bone* 2008;43:1115-21.



63. El Maghraoui A, Achemlal L, Bezza A. Monitoring of dual-energy X-ray absorptiometry measurement in clinical practice. *J Clin Densitom.* 2006 Jul-Sep;9(3):281-6.
64. Baim S, Wilson CR, Lewiecki EM, Luckey MM, Downs RW Jr, Lentle BC. Precision assessment and radiation safety for dual-energy X-ray absorptiometry: position paper of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Densitom* 2005;8:371-8.
65. Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res* 1993;8:1137-48.
66. Domiciano DS, Figueiredo CP, Lopes JB, Kuroishi ME, Takayama L, Caparbo VF, et al. Vertebral fracture assessment by dual X-ray absorptiometry: a valid tool to detect vertebral fractures in community-dwelling older adults in a population-based survey. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2013 May;65(5):809-15.
67. Vilayphiou N, Boutroy S, Sornay-Rendu E, Van Rietbergen B, Chapurlat R. Age-related changes in bone strength from HR-pQCT derived microarchitectural parameters with an emphasis on the role of cortical porosity. *Bone* 2016;83:233-40.
68. Alvarenga JC, Fuller H, Pasoto SG, Pereira RM. Age-related reference curves of volumetric bone density, structure, and biomechanical parameters adjusted for weight and height in a population of healthy women: an HR-pQCT study. *Osteoporos Int* 2017;28:1335-46.

- 
69. van Rietbergen B, Weinans H, Huiskes R, Odgaard A. A new method to determine trabecular bone elastic properties and loading using micromechanical finite-element models. *J Biomech* 1995;28:69-81.
70. Pitta F, Troosters T, Spruit MA, Decramer M, Gosselink R. Activity monitoring for assessment of physical activities in daily life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Phys Med Rehabil*. 2005;86 (10):1979-85.
71. Pitta F, Troosters T, Probst VS, Spruit MA, Decramer M, Gosselink R. Quantifying physical activity in daily life with questionnaires and motion sensors in COPD. *Eur Respir J*. 2006;27(5):1040-1055.
72. Tudor-Locke C, Craig CL, Thyfault JP, Spence JC. A step-defined sedentary lifestyle index: <5000 steps/day. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*. 2013; 38:100-14
73. McCullagh P, Nelder JA. Generalized linear models. 2<sup>nd</sup> ed. 1989. Chapman and Hall: New York, USA. p.511.
74. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied Linear Statistical Models. 4<sup>th</sup> ed. 1996. Illinois: Richard D. Irwing. p.1408.
75. Khush KK, Cherikh WS, Chambers DC, Goldfarb S, Hayes D Jr., Kucheryavaya AY, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fifth Adult Heart Transplantation Report-2018; Focus Theme: Multiorgan Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2018;37:1155-68.

- 
76. Koster JC, Hackeng WH, Mulder H. Diminished effect of etidronate in vitamin D deficient osteopenic postmenopausal women. *Eur J Clin Pharmacol* 1996;51:145-7.
77. Wimalawansa SJ. Combined therapy with estrogen and etidronate has an additive effect on bone mineral density in the hip and vertebrae: four-year randomized study. *Am J Med* 1995;99:36-42.
78. Lems WF, Geusens P. Are bisphosphonates effective and safe in patients with low serum vitamin D levels? *Int. J. Clin. Rheumatol* 2009;4:119–121.
79. Carmel AS, Shieh A, Bang H, Bockman RS. The 25(OH)D level needed to maintain a favorable bisphosphonate response is  $\geq 33$  ng/ml. *Osteoporos Int* 2012;23:2479-87.
80. Van Cleemput J, Daenen W, Nijs J, Geusens P, Dequeker J, Vanhaecke J. Timing and quantification of bone loss in cardiac transplant recipients. *Transpl Int* 1995;8:196-200.
81. Hars M, Trombetti A. Body composition assessment in the prediction of osteoporotic fractures. *Curr Opin Rheumatol* 2017;29:394-401.
82. Leslie WD, Orwoll ES, Nielson CM, Morin SN, Majumdar SR, Johansson H, et al. Estimated lean mass and fat mass differentially affect femoral bone density and strength index but are not FRAX independent risk factors for fracture. *J Bone Miner Res* 2014;29:2511-9.
83. Uchmanowicz I, Młynarska A, Lisiak M, Kałużna-Oleksy M, Wleklík M, Chudiak A, et al. Heart Failure and Problems with Frailty Syndrome:

- Why it is Time to Care About Frailty Syndrome in Heart Failure. *Card Fail Rev.* 2019;5:37-43.
84. Lange U, Classen K, Müller-Ladner U, Richter M. Weekly oral bisphosphonates over 2 years prevent bone loss in cardiac transplant patients. *Clin Transplant* 2017;31(11).
85. Vest AR, Chan M, Deswal A, Givertz MM, Lekavich C, Lennie T, et al. Nutrition, Obesity, and Cachexia in Patients With Heart Failure: A Consensus Statement from the Heart Failure Society of America Scientific Statements Committee. *J Card Fail.* 2019 May;25(5):380-400.
86. Bottiger BA, Nicoara A, Snyder LD, Wischmeyer PE, Schroder JN, Patel CB, et al. Frailty in the End-Stage Lung Disease or Heart Failure Patient: Implications for the Perioperative Transplant Clinician. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2019 May;33(5):1382-1392.
87. Khan RS, Kato TS, Chokshi A, Chew M, Yu S, Wu C, et al. Adipose tissue inflammation and adiponectin resistance in patients with advanced heart failure: correction after ventricular assist device implantation. *Circ Heart Fail* 2012;5:340–8.
88. Vest AR, Mistak SM, Hachamovitch R, Mountis MM, Moazami N, Young JB. Outcomes for patients with diabetes after continuous-flow left ventricular assist device implantation. *J Card Fail* 2016;22:789–96.
89. Vest AR, Kennel PJ, Maldonado D, Young JB, Mountis MM, Naka Y, et al. Recovery of serum cholesterol predicts survival after left ventricular assist device implantation. *Circ Heart Fail* 2016;9:e002881.

90. Ahmad T, Wang T, O'Brien EC, Samsky MD, Pura JA, Lokhnygina Y, et al. Effects of left ventricular assist device support on biomarkers of cardiovascular stress, fibrosis, fluid homeostasis, inflammation, and renal injury. *JACC Heart Fail* 2015;3:30–9.
91. Emani S, Brewer RJ, John R, Slaughter MS, Lanfear DE, Ravi Y, Sundareswaran KS, et al. Patients with low compared with high body mass index gain more weight after implantation of a continuous-flow left ventricular assist device. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:31–5.