

Concentração sérica de paratormônio intacto em cães com insuficiência renal crônica

[Serum concentration of intact parathormone in dogs with chronic renal failure]

P. Lazaretti¹, M.M. Kogika^{2*}, M.K. Hagiwara², M.D. Lustoza¹, R.M.S. Mirandola²

¹Médico veterinário autônomo

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87

05508-000 - São Paulo, SP

RESUMO

Estudou-se a ocorrência de hiperparatireoidismo secundário renal e determinaram-se as concentrações séricas de paratormônio intacto (PTHi-c), cálcio total e fósforo em 30 cães com insuficiência renal crônica (IRC) e em 40 cães saudáveis. Para a determinação do PTHi-c, foi utilizado o método imunofluorométrico, com o emprego de anticorpos anti-aminoterminal (extraídos de gema de ovo de galinha) e de anticorpos monoclonais anti-carboxiterminal (H5P10), marcados com Europium. As concentrações séricas de PTHi-c ($717,23 \pm 469,13$ pg/ml no grupo IRC e $36,76 \pm 34,40$ pg/ml no grupo-controle; $P=0,0001$), cálcio total ($11,46 \pm 2,03$ mg/dl no grupo IRC e $10,11 \pm 0,91$ mg/dl no grupo-controle; $P=0,003$) e fósforo ($12,01 \pm 8,06$ mg/dl no grupo IRC e $4,33 \pm 0,74$ mg/dl no grupo-controle; $P=0,0001$) foram mais altas nos cães com IRC. Observou-se estreita correlação entre PTHi-c e fósforo ($r=0,56$; $P=0,0006$), o que não ocorreu entre PTHi-c e cálcio. Hipercalcemia em cães com alta concentração de PTHi-c demonstrou a possível ocorrência de hiperparatireoidismo terciário em 11 animais. A hiperfosfatemia pode indicar, de forma indireta, a ocorrência de hiperparatireoidismo secundário nos cães com IRC.

Palavras-chave: cão, insuficiência renal crônica, cálcio, fósforo, paratormônio

ABSTRACT

The occurrence of renal secondary hyperparathyroidism was studied and serum intact parathormone (PTHi-c), total calcium and phosphorus were measured in thirty dogs with chronic renal failure (CRF) and in forty healthy dogs. The immunofluorometric method was used for the PTHi-c assay, using anti-aminoterminal antibodies (obtained from chicken yolk) and anti-carboxiterminal monoclonal antibodies (H5P10), marked with Europium. Mean value \pm SD of serum concentration of PTHi-c was 717.23 ± 469.13 pg/ml in CRF group and 36.76 ± 34.40 pg/ml in control group ($P=0.0001$); for total calcium it was 11.46 ± 2.03 mg/dl in CRF group and 10.11 ± 0.91 mg/dl in control group ($P=0.003$); and for phosphorus it was 12.01 ± 8.06 mg/dl in CRF group and 4.33 ± 0.74 mg/dl in control group ($P=0.0001$). The highest values were observed in CRF dogs. A positive correlation between PTHi-c and phosphorus was observed ($r=0.56$; $p=0.0006$), and no correlation was detected between PTHi-c and total calcium. In dogs with CRF, hypercalcemia in presence of high level of serum PTHi-c showed a possible indication of tertiary hyperparathyroidism in 11 animals. In conclusion, hyperphosphatemia could indirectly demonstrate the occurrence of secondary hyperparathyroidism in CRF dogs.

Keywords: dogs, chronic renal failure, calcium, phosphorus, parathormone

Recebido em 26 de julho de 2004

Aceito em 16 de fevereiro de 2006

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: mmkogika@usp.br

Apoio: FAPESP (98/04637-1)

INTRODUÇÃO

O hiperparatireoidismo secundário, que se manifesta clinicamente sob a forma de desmineralização óssea e alterações na homeostase do cálcio no decurso da insuficiência renal crônica (IRC), apresenta especial interesse na clínica de cães e gatos. O desequilíbrio do metabolismo de cálcio e de fósforo ocorre como conseqüência da gradativa perda da capacidade funcional dos rins, o que promove estímulo da paratireóide e aumento da secreção de paratormônio (PTH), na tentativa de manutenção da homeostase do cálcio. O PTH promove a desmineralização óssea e a calcificação de tecidos moles, incluindo deposição de cálcio no parênquima renal (Krueger e Osborne, 1995; Krueger et al., 1996), o que contribui para a perda de mais néfrons. A excessiva quantidade de PTH circulante resulta também na diminuição da eritropoiese (Cowgill, 1995), alteração na função leucocitária, lesão de hepatócitos e redução na contratilidade do músculo cardíaco (Massry e Smogorzewski, 1997).

A hipersecreção de PTH ocorre em resposta à hipocalcemia, presente nos quadros de IRC. A estimulação persistente da paratireóide pode ocasionar hiperplasia difusa (Van Vonderen et al., 2003) e metaplasia das glândulas, que podem assumir características adenomatosas, tornando-se autônomas (Krueger et al., 1996), secretando PTH mesmo em presença de hipercalcemia. Isto pode ocorrer nos estádios avançados da IRC, resultando no hiperparatireoidismo terciário (Fukagawa et al., 1997). A hiperfosfatemia e, principalmente, a comprovação de desmineralização óssea em animais com IRC permitem estabelecer o diagnóstico provável de hiperparatireoidismo secundário renal (Polzin et al., 1995). Entretanto, o diagnóstico definitivo de hiperparatireoidismo secundário e terciário deve ser realizado pela mensuração do paratormônio intacto (PTHi) sérico concomitantemente à avaliação da calcemia (Krueger e Osborne, 1995).

Os testes anteriormente utilizados, baseados na quantificação de fragmentos carboxi-terminais (35-84 C terminal) do PTH não permitiam avaliar a real produção de PTH em cães com IRC, já que a redução da filtração glomerular promove o acúmulo dos fragmentos

carboxiterminais inativos da molécula (Torrance e Nachreiner, 1989b; Vieira et al., 1995).

O método imunorradiométrico, utilizado para a detecção do PTH intacto humano (PTHi-hu), foi adaptado para uso em cães por Torrance e Nachreiner (1989a), o que possibilitou a mensuração fidedigna do PTHi canino (PTHi-c). Segundo Rosol et al. (1995), a seqüência do DNA canino responsável pela síntese do PTH apresenta 88% de homologia em relação à seqüência humana, havendo a diferença de apenas dois aminoácidos, nas posições 7 e 16, o que torna possível a utilização de anticorpos anti-PTH-hu em ensaios com material proveniente de cães. Vieira et al. (1994) padronizaram o método fluorométrico, que, à semelhança do método imunorradiométrico, promove a ligação dos anticorpos específicos em dois sítios, com a vantagem de não ser necessário o emprego de material radioativo.

Considerando-se a homologia entre o PTHi-hu e PTHi-c, conforme Rosol et al. (1995) e os ensaios de Torrance e Nachreiner (1989a), com a utilização de anticorpos para PTHi-hu adotou-se o método imunofluorométrico com o objetivo de determinar a concentração sérica de PTHi-c em cães com IRC e correlacionar esses valores com as concentrações séricas de cálcio total e de fósforo.

MATERIAL E MÉTODOS

O grupo I foi constituído por 30 cães de diversas raças ou sem raça definida, de diferentes faixas etárias, machos ou fêmeas, atendidos em 1999-2000 quando se confirmou a existência de IRC. Como critério de inclusão, foram levadas em consideração a evolução clínica de mais de 15 dias e as concentrações séricas de uréia e creatinina de, no mínimo, 80mg/dL e de 2,0mg/dl, respectivamente, após reposição volêmica. Constituíram o grupo II (controle) 40 cães saudáveis, domiciliados, idades variáveis entre um e 12 anos, independentemente do sexo e da raça, nos quais se confirmou a inexistência de qualquer doença renal, neoplasia ou alterações metabólicas minerais primárias por meio do exame clínico, exame de urina, hemograma e bioquímica sanguínea.

Concentração sérica...

As amostras de sangue, colhidas pela manhã após jejum de 10 horas, foram transferidas para tubos a vácuo, isentos de íons com gel separador¹, mantido à temperatura de 4°C por duas horas. Após a formação do coágulo, os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada² por 15min a 1500g; o soro obtido foi dividido em duas alíquotas, mantidas a -20°C até as determinações de PTHi-c, cálcio total, fósforo, albumina, uréia, creatinina e proteína total.

Para a mensuração do PTHi-c, foi utilizado o método imunofluorométrico com dois sítios de ligação (Vieira et al., 1994). Em uma placa de microtitulação de 96 poços³ cobertos com 2µg de antiimunoglobulina de galinha (D7P4), foram colocados, em cada orifício, 100µl do soro a ser testado e 100µl de anticorpos anti-tiaminoterminal (extraído de gema de ovo de galinha, diluído a 1:50 em solução salina a 0,9%). À placa, homogeneizada e incubada a 4°C por duas horas, lavada com solução tampão (50nM Tris-HCl, pH7,4, com 0,9% NaCl, 0,05% azida sódica e 0,05% Twen-20), adicionaram-se 200µl da solução 1:500 de anticorpos monoclonais de anticarboxiterminal (H5P10), marcados com Europium⁴; homogeneizada à temperatura ambiente por duas horas, procedeu-se à nova lavagem para a retirada do excesso de anticorpos não ligados a moléculas de PTHi-c. Após adição de solução amplificadora, a fluorescência foi mensurada em fluorômetro⁵. A partir dos valores obtidos da curva padrão, calculou-se a concentração final de PTHi-c de cada amostra.

Para a determinação do cálcio total, foi utilizado o método colorimétrico com cresolftaleína (Sarkar et al., 1967) em analisador automático⁶. Sempre que os valores séricos de albumina foram menores do que 3,5g/dl, realizou-se a correção do cálcio total, de acordo com a fórmula proposta por Chew e Meuten (1982): cálcio corrigido = (cálcio total - albumina sérica) + 3,5.

As determinações das concentrações séricas de fósforo e albumina foram realizadas em analisador automático⁶, de acordo com a técnica

de molibdato de sódio (Berti et al., 1987) e a técnica de Doumas–Biggs modificada (Watson et al., 1971), respectivamente.

Os dados foram avaliados inicialmente quanto à distribuição paramétrica, utilizando-se o método estatístico Shapiro–Wilks. Aqueles que apresentaram distribuição normal foram comparados por meio do teste t de Student. As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste não paramétrico bicaudal de Mann-Whitney. Na estimativa das correlações entre os valores de PTHi-c e de cálcio e fósforo séricos, utilizou-se o teste não paramétrico de Spearman. Em todos os testes, o valor de α considerado foi de 5%. Foram utilizados os programas estatísticos StataTM, versão 5.0, e InSTAT, versão 2.01, segundo Sampaio (1998).

RESULTADOS

A concentração sérica de PTHi nos cães com IRC variou de 15,0 a 1.658,0pg/ml. Em 28 dos 30 animais avaliados as concentrações foram mais altas do que os valores máximos obtidos nos cães saudáveis (2,5 a 176 pg/ml). Os valores das medianas, máximos e mínimos e o intervalo de confiança ($\alpha=5\%$) de PTHi dos cães com IRC e do grupo-controle são apresentados na Tab. 1. Observou-se diferença ($P=0,0001$) entre os grupos.

Tabela 1. Valores da mediana, mínimo e máximo e do intervalo de confiança das concentrações séricas de paratormônio intacto (PTHi-c) em cães com insuficiência renal crônica (grupo I) e em cães saudáveis (grupo II)

PTHi-c (pg/ml)	Grupo I (n=30)	Grupo II (n=40)
Mediana	620,0a	28,5b
Valor mínimo	15,0	2,50
Valor máximo	1.658,0	176,0
Intervalo de confiança	46,0 – 1.497,0	4,0 – 126,0

a \neq b (Mann-Whitney – bicaudal; $P=0,0001$).

As concentrações séricas de cálcio e fósforo foram maiores (Tab. 2) nos animais com IRC ($P=0,003$ e $P=0,0001$, respectivamente).

¹ Tubo Vacutainer® SST, Becton Dickinson, Plymouth, UK.

² SORVALL®, RT7, Kendro Laboratory Products, USA.

³ Nunc Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark

⁴ Europium labelling kit, Wallac Oy, Turku, Finland

⁵ Model 1232, Wallac

⁶ RA-100 Clinical Analyser, Technicon®, New York, USA.

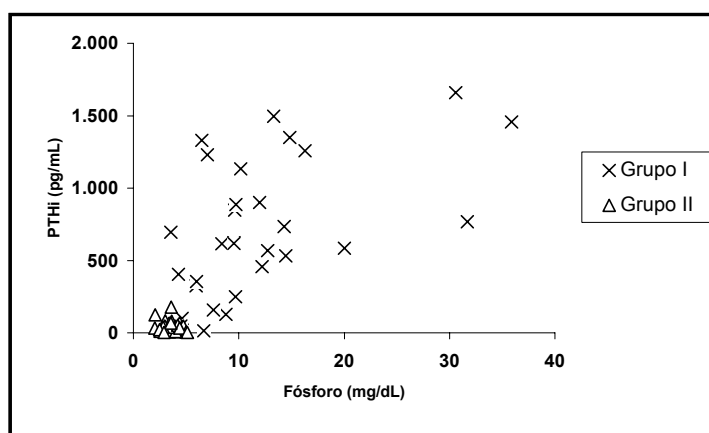
Tabela 2. Valores da média, desvio-padrão da média (DPM) e erro-padrão da média (EPM) das concentrações séricas de cálcio total corrigido (mg/dl) e de fósforo (mg/dl) em cães com insuficiência renal crônica (grupo I) e em cães sádios (grupo II)

	Cálcio total corrigido (mg/dl)		Fósforo (mg/dl)	
	Grupo I (n=30)	Grupo II (n=40)	Grupo I (n=30)	Grupo II (n=40)
Média	11,46a	10,11b	12,01c	4,33d
DPM	2,03	0,91	8,06	0,74
EPM	0,37	0,14	1,47	0,12

a ≠ b para o cálcio (Teste t de Student; P=0,0003).

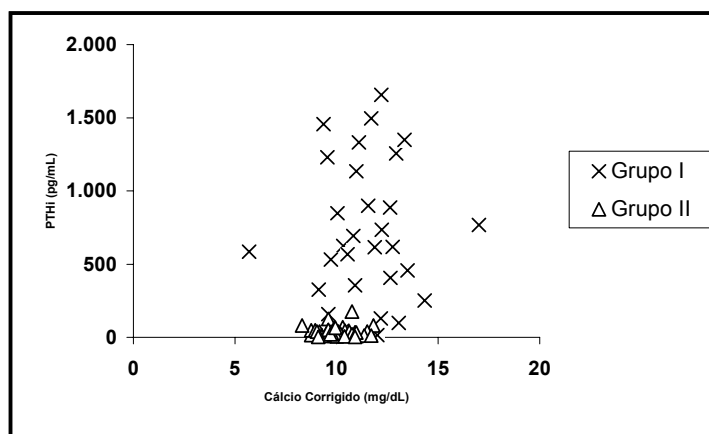
c ≠ d para o fósforo (Teste t de Student; P=0,0001).

Com exceção de um animal que apresentou hiperfosfatemia e concentração sérica de PTHi-c (126pg/ml) semelhante à dos animais-controle, todos os cães hiperfosfatêmicos apresentaram alta concentração de PTHi-c. Observou-se correlação positiva entre as concentrações séricas de fósforo e de PTHi-c ($r=0,56$; $P=0,0006$) (Fig. 1), o que não ocorreu entre as concentrações de cálcio total corrigido e PTHi-c ($r=0,14$; $P=0,2151$) (Fig. 2). Entretanto, observou-se que 11 cães com IRC apresentavam hipercalcemia e valores aumentados de PTHi.



(Spearman, $r=0,56$; $P=0,0006$)

Figura 1. Correlação entre os valores das concentrações séricas de paratormônio intacto (PTHi) e fósforo de cães com insuficiência renal crônica (grupo I; n=30) e de cães do grupo sádios (grupo II; n=40).



(Spearman, $r=0,14$; $P=0,2151$)

Figura 2. Correlação entre os valores das concentrações séricas de paratormônio intacto (PTHi) e cálcio total corrigido de cães com insuficiência renal crônica (grupo I; n=30) e de cães sádios (grupo II; n=40).

DISCUSSÃO

A alta concentração sérica de PTHi nos cães com IRC confirma a condição de hiperfuncionalidade das paratireóides nesses animais. Sem essa avaliação, torna-se difícil estabelecer o diagnóstico clínico de hiperparatireoidismo secundário renal, pois nem sempre a desmineralização óssea é detectada clinicamente ou por meio de imagens radiológicas. Isto é possível somente quando ocorre a perda de 30% a 50% da massa óssea (Campos et al., 2003). Nos cães com IRC, a hiperfosfatemia permite supor a existência de hipersecreção da paratireóide. A correlação positiva observada entre as concentrações séricas de fósforo e de PTHi-c confirma a hipótese e, na impossibilidade de determinação de PTHi-c, fornece, de forma indireta, informações quanto à estimulação da paratireóide.

A imunofluorometria (Vieira et al., 1994), método que ainda não havia sido utilizado em cães, mostrou-se eficiente para a determinação de PTHi-c. Os valores obtidos nos cães sem IRC foram semelhantes aos citados por Torrance e Nachreiner (1989a), que obtiveram, em 85 cães, valores entre 16 a 136pg/ml. Além de possibilitar a mensuração apenas do PTHi-c, por ser uma técnica em que há dupla ligação de anticorpos, nos terminais amino- e carboxi- do PTHi, o que não ocorria com os métodos em que havia a ligação dos anticorpos apenas nos carboxiterminais (Vieira et al., 1995; Torrance e Nachreiner, 1989b), o método imunofluorométrico apresenta a vantagem de não utilizar reagentes radioativos e apresentar sensibilidade e especificidade semelhantes às do método imunorradiométrico.

Em quatro cães com IRC, os valores de fósforo sérico foram próximos aos dos cães normais, entretanto dois deles apresentaram concentração sérica de PTHi mais alta. É possível que pequenas oscilações nas concentrações séricas de cálcio ou de fósforo em cães com IRC sejam suficientes para promover a hipersecreção de PTH (Slatopolsky e Bricker, 1973). Apenas um dos cães com IRC apresentou concentração sérica de PTHi menor do que 126pg/ml, valor considerado normal (igual ao dos cães do grupo-controle) e, simultaneamente, valores elevados de fósforo e cálcio, o que pode indicar a

capacidade de resposta da paratireóide ao mecanismo *feed back* à normo ou hipercalcemia (Torrance e Nachreiner, 1989b). Uma vez alcançada a homeostase do cálcio, como resultado da atuação do PTH sobre a reabsorção óssea, estímulo da reabsorção tubular de cálcio e absorção de cálcio através da mucosa intestinal (Rosol e Capen, 1996), cessa o estímulo sobre as glândulas paratireóides. A normocalcemia é o resultado esperado da atuação do PTH e subseqüentemente o retorno da concentração sérica de PTHi-c aos valores basais (Torrance e Nachreiner, 1989b).

Embora os valores de cálcio total corrigido fossem mais elevados nos cães com IRC, a não correlação, negativa ou positiva, entre cálcio total corrigido e PTHi-c aparentemente indica que se trata de variáveis independentes. Sabe-se que o estímulo da paratireóide, com a subseqüente liberação do PTH, promove o aumento do cálcio ionizado, que corresponde a cerca de 50% do cálcio total sérico (Rodriguez et al., 1991; Slatopolsky et al., 1999).

Assim, apenas a mensuração do cálcio total não reflete a real homeostase do cálcio, havendo necessidade de mensuração do cálcio iônico (Ca^{++}), a fração biologicamente ativa do mineral.

A persistência da hiperfosfatemia resulta no estímulo contínuo da paratireóide, que, após algum tempo, pode-se tornar autônoma, o que se traduz em valores elevados de PTHi-c na presença de hipercalcemia (Krueger et al., 1996). Essa condição mórbida, denominada hiperparatireoidismo terciário (Krueger e Osborne, 1995; Krueger et al., 1996), foi observada em 11 cães com IRC. As glândulas hiperplásicas, devido ao estímulo constante, apresentam menor sensibilidade ao cálcio e calcitriol (Fukagawa et al., 1997), o que pode justificar, em parte, a autonomia adquirida pelas glândulas paratireóides na IRC mais grave (Fukagawa et al., 1997; Slatopolsky, 1998).

Dessa forma, este estudo evidencia a ocorrência do hiperparatireoidismo secundário na IRC canina e a possibilidade da utilização do fósforo sérico como marcador indireto da hiperestimulação das paratireóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTI, G.; FOSSATI, P.; ERIL, G.V.M. et al. Enzymatic colorimetric assay of inorganic phosphate. *Clin. Chem.*, v.33, p.312, 1987.
- CAMPOS, L.M.A.; LIPHAUS, B.L.; SILVA, C.A.A. et al. Osteoporose na infância e na adolescência. *J. Pediat.*, v.79, p.481-488, 2003.
- CHEW, D.J.; MEUTEN, D.J. Disorders of calcium and phosphorus metabolism. *Vet. Clin. N. Am.: Small Anim. Pract.*, v.12, p.411-438, 1982.
- COWGILL, L.D. Medical management of the anemia of chronic renal failure In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. *Canine and feline nephrology and urology*. Philadelphia: Willians & Wilkins, 1995. p.539-554.
- FUKAGAWA, M.; KITAOKA, M.; KUROKAWA, K. Resistance of the parathyroid glands to vitamin D in renal failure: Implications for medical management. *Kidney Int.*, v.52, suppl.62, p.S60-S64, 1997.
- KRUEGER, J.M.; OSBORNE, C.A. Canine and feline hypercalcemic nephropathy. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. *Canine and feline nephrology and urology*. Philadelphia: Willians & Wilkins, 1995. p.416-440.
- KRUEGER, J.M.; OSBORNE, C.A.; NACHREINER, R.F. et al. Hypercalcemia and renal failure, etiology, pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Vet. Clin. N. Am.: Small Anim. Pract.*, v.26, p.1417-1445, 1996.
- MASSRY, S.G.; SMOGORZEWSKI, M. Parathyroid hormone, chronic renal failure and the liver. *Kidney Int.*, v.52, suppl.62, p.S5-S7, 1997.
- POLZIN, D.J.; OSBORNE, C.A.; BARTGES, J.W. et al. Chronic renal failure. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Textbook of veterinary internal medicine*. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. p.1734-1760.
- RODRIGUEZ, M.; MALO-MARTIN, A.; MARTINEZ, M.E. et al. Calcemic response to parathyroid hormone in renal failure: Role of phosphorus and its effect on calcitriol. *Kidney Int.*, v.40, p.1055-1062, 1991.
- ROSOL, T.J.; CAPEN, C.C. Pathophysiology of calcium, phosphorus, and magnesium metabolism in animals. *Vet. Clin. N. Am.: Small Anim. Pract.*, v.26, p.1155-1184, 1996.
- ROSOL, T.J.; STEINMEYER, C.L.; MCCAULEY, L.K. et al. Sequence of the cDNAs encoding canine parathyroid hormone-related protein and parathyroid hormone. *Gene*, v.160, p.241-243, 1995.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 1998. 221p.
- SARKAR, B.C.; CHAUHAN, U.P.S. A new method for determining micro quantities of calcium in biological material. *An. Biochem.*, v.20, p.155-165, 1967.
- SLATOPOLSKY, E.; BRICKER, N.S. The role of phosphorus restriction in prevention of secondary hyperparathyroidism in chronic renal disease. *Kidney Int.*, v.4, p.141-145, 1973.
- SLATOPOLSKY, E. The role of calcium, phosphorus and vitamin D metabolism in the development of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v.13, suppl.3, p.S3-S8, 1998.
- SLATOPOLSKY, E.; BROWN, A.; DUSSO, A. Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.*, v.56, suppl.73, p.S14-S19, 1999.
- TORRANCE, A.G.; NACHREINER, R. Human-parathormone assay for use in dogs validation, sample handling studies, and parathyroid function testing. *Am. J. Vet. Res.*, v.50, p.1123-1127, 1989a.
- TORRANCE, A.G.; NACHREINER, R. Intact parathyroid hormone assay and total calcium concentration in the diagnosis of disorders of calcium metabolism in dogs. *J. Vet. Int. Med.*, v.3, p.86-89, 1989b.
- VAN VONDEREN, I.K.; KOOISTRA, H.S.; PEETERS, M.E. et al. Parathyroid hormone immunohistochemistry in dogs with primary and secondary hyperparathyroidism: the question of adenoma and primary hyperplasia. *J. Comp. Pathol.*, v.129, p.61-69, 2003.
- VIEIRA, J.G.H.; NISHIDA, S.K.; KASAMATSU, T.S. et al. Development and clinical application of an immunofluorometric assay for intact parathyroid hormone. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.27, p.2379-2382, 1994.
- VIEIRA, J.G.H.; OLIVEIRA, M.A.D.; KUNII, I. Dosagem de paratormônio (PTH) no soro ou plasma: a evolução dos imunoenaios. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v.39, p.75-79, 1995.
- WATSON, W.A.; DOUMAS, B.T.; BIGGS, H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim.*, v.37, p.87-96, 1971.