

VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE PARATORMÔNIO INTACTO EM CÃES

Luiz Henrique de Araújo Machado¹
Flávio Quaresma Moutinho²

RESUMO

O presente trabalho objetivou testar o método da quimioluminescência para determinação do paratormônio (PTH) intacto em cães. Foi formado um grupo de estudo para estabelecer o padrão de normalidade da quimioluminescência em que foram utilizados 60 cães adultos saudáveis, sem distinção de sexo ou raça. Destes cães 66,7% apresentaram valores de PTH abaixo do limite de detecção do método demonstrando que este pode não ser eficiente.

Palavras-chave: cães; paratormônio; quimioluminescência.

EVALUATION OF CHEMILUMINESCENT ASSAY ON DETERMINATION OF INTACT PARATHORMONE IN DOGS

ABSTRACT

The present study had the aim to test chemiluminescent assay on intact parathormone (PTH) determination in dogs. A study group of 60 healthy adult dogs, with no sex or breed distinction, was formed in order to establish a pattern of normality of chemiluminescence. Of these, 66,7% presented values of PTH below the limit of detection of the method, which demonstrates that this assay may not be efficient for the determination of intact PTH in dogs.

Keywords: dogs; parathormone; chemiluminescence.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE QUIMIOLUMINISCENCIA PARA LA DETERMINACIÓN DE PARATHORMONA INTACTA EN PERROS

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar el método de la quimioluminiscencia para la determinación de la parathormona (PTH) intacta en perros. Se formó un grupo de estudio para establecer el modelo de normalidad de la quimioluminiscencia formado por 60 perros adultos sanos, sin distinción de sexo o raza. De estos perros, el 66,7% presentó valores de PTH por debajo del límite de detección del método, demostrando que este puede no ser eficiente.

Palabras clave: perros; parathormona; quimioluminiscencia.

¹ Prof. Ass. Dr. do Depto. de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu, Distrito de Rubião Jr. S/N. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000, henrique@fmvz.unesp.br, (14) 38802043. Autor para correspondência

² Prof. Dr. do Depto. de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu, Distrito de Rubião Jr. S/N. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000, quaresma@fmvz.unesp.br, (14) 38116280

INTRODUÇÃO

O paratormônio, polipeptídeo de cadeia simples, contendo 84 aminoácidos (1-4), atua no metabolismo de cálcio e fósforo facilitando a absorção destes nos intestinos, a reabsorção óssea de ambos e aumentando a reabsorção do cálcio, a excreção de fósforo e a produção de calcitriol nos rins (1, 3, 5-7).

A existência de três frações do hormônio, a amino-terminal [1-34], carboxi-terminal [39-84] e a fração intacta, foi demonstrada experimentalmente (8).

O hiperparatireoidismo é uma enfermidade metabólica caracterizada por uma osteodistrofia fibrosa generalizada (9-12) decorrente de reabsorção óssea e substituição do tecido ósseo por tecido conjuntivo fibroso (11, 13).

Existem duas formas de hiperparatireoidismo, a forma primária, decorrente de neoplasias nas paratireóides (14) e a secundária, que pode ser nutricional (11, 13, 15) ou decorrente de moléstias renais (11, 16, 17), sendo esta última a mais frequente.

As alterações características do hiperparatireoidismo secundário à moléstia renal (HSR) são hipocalcemia, hiperfosfatemia e aumento do PTH sérico com conseqüente alteração óssea como resposta (7, 17, 18).

A elevação do PTH no HSR se dá pela baixa concentração de calcitriol e pela hiperfosfatemia, que induzem a hipocalcemia pela formação de complexo Ca:P, fatores que levam a uma diminuição da retroalimentação negativa do PTH (6, 7). Com a progressão da doença ocorre resistência óssea ao PTH, sendo necessárias concentrações cada vez maiores do hormônio para manutenção dos níveis de cálcio, ocorrendo hiperplasia glandular (6, 7, 19-22).

Com a lesão renal ocorre um acúmulo das frações amino-terminal, intacta e, principalmente, da carboxi-terminal do PTH (2, 21). A fração amino-terminal, que é ativa, está aumentada de 2 a 10 vezes, enquanto a carboxi-terminal, biologicamente inativa, está aumentada de 50 a 200 vezes (2). A atividade das frações é medida pela capacidade de ativar a adenilciclase nos órgãos alvo, enzima que promove a conversão de ATP em AMP cíclico, desencadeando as ações celulares nos tecidos alvo (1, 2, 4, 23).

Os sinais clínicos do HSR são variados, incluindo osteodistrofia renal (1, 6, 20, 24, 25), calcificação de tecidos moles, anemia, hemorragias, intolerância à glicose, prurido, hiperlipidemia e disfunções sexuais (2, 7, 26), bem como necrose de tecidos moles em humanos com aumento do paratormônio (26).

O diagnóstico do HSR é baseado na concentração sérica elevada de PTH, associada a alterações renais e hiperfosfatemia (7, 17, 18).

O método analítico mais utilizado para mensuração do PTH sérico é o radioimunoensaio (RIA), utilizando o iodo radioativo [¹²⁵I]. Originalmente desenvolvido para mensuração em humanos, foi padronizado para utilização em animais, com a utilização de anticorpo policlonal de ovelha. Vários testes foram estudados, levando em consideração o tipo de fragmento do PTH, podendo-se mensurar os fragmentos amino [1-34] ou carboxi-terminal [39-84] e o hormônio intacto (3, 27-31). Existe a opção pela mensuração do hormônio intacto como melhor forma de predizer a função das paratireóides por não levar em conta o aumento da fração N-terminal, que é inativa e está mais aumentada no HSR (30). Os valores normais relatados pelo método do radioimunoensaio são 17,8 mEq/mL (27), 10 a 30 pg/mL (3, 28, 31) e 14 a 34 pg/mL (29).

Atualmente estão sendo pesquisados outros métodos para serem utilizados como alternativa ao radioimunoensaio, sendo que os principais motivos são os fatores de segurança (32, 33) e o tempo de incubação (34). Um destes é o método da imunoquimioluminescência (ICMA), que demonstra boa correlação com o radioimunoensaio (30, 35), apresentando melhor sensibilidade do que o RIE (30) e pode ser utilizado em transoperatório, com apenas sete minutos de incubação, ao contrário do radioimunoensaio que possui tempo de incubação de 22 horas (34). Este método, já testado em humanos, possui dois anticorpos, o anti-PTH 1-

34 e o anti-PTH 44-84, porém a dosagem em caninos deve ser feita pelo uso de anti-PTH 1-34 e anti-PTH 39-84 (36).

O presente experimento teve por objetivos: determinar a especificidade e a eficiência do método da quimioluminescência para determinação dos valores normais de paratormônio intacto na espécie canina; determinar o valor normal do paratormônio intacto em cães pelo método da quimioluminescência e viabilizar o método da quimioluminescência para o diagnóstico do hiperparatireoidismo secundário à IRC, possibilitando ao clínico a escolha de uma forma mais simples e rápida de diagnóstico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção e número de animais

Neste estudo foram utilizados 60 cães adultos, provenientes do canil do Biotério Central do Campus de Botucatu, escolhidos sem distinção de sexo ou raça e testados para descartar doenças que interfeririam no metabolismo de cálcio.

Foram excluídos os cães que apresentavam alterações da estrutura óssea e do metabolismo do cálcio, como: nefropatias, fraturas, neoplasias, hiperadrenocorticismos e terapia com drogas que pudessem interferir no estudo.

Dosagem do PTH intacto sérico de cães sadios

O PTH intacto sérico [1-84] foi dosado utilizando-se a técnica de imunoquimioluminescência³ com anticorpos específicos, anticorpo antiPTH 44-84 e antiPTH 1-34, medindo imunocomplexos, após incubação, pela luminescência produzida pela reação química.

A precisão intra-ensaio foi determinada pela repetição de 10 % das amostras da seguinte forma, a cada dez ensaios repetiu-se o décimo.

Análise Estatística

Para a variável observada no experimento foram apresentadas as estatísticas descritivas de média e desvio padrão amostral, a variação dos valores dos testes intra-ensaio não foi superior a 5%.

RESULTADOS

Paratormônio intacto dos animais sadios

Os valores encontrados apresentaram variação entre <1 e 7,4 pg/mL (Tabela 1). Em 66,7% dos animais os valores encontravam-se abaixo do valor mínimo de detecção do método (<1 pg/mL).

³ Immulite intact PTH® - DPC

Tabela 1. Valores de PTH intacto dos animais sadios

| Animal | PTH (pg/mL) | Animal | PTH (pg/mL) |
|--------|-------------|--------|-------------|
| 1 | <1 | 31 | <1 |
| 2 | <1 | 32 | <1 |
| 3 | <1 | 33 | <1 |
| 4 | <1 | 34 | <1 |
| 5 | <1 | 35 | <1 |
| 6 | 4.6 | 36 | <1 |
| 7 | 2.1 | 37 | <1 |
| 8 | <1 | 38 | 1.5 |
| 9 | <1 | 39 | <1 |
| 10 | 2.5 | 40 | <1 |
| 11 | 7.0 | 41 | 4.6 |
| 12 | <1 | 42 | 3.1 |
| 13 | <1 | 43 | 2.1 |
| 14 | <1 | 44 | <1 |
| 15 | 1.5 | 45 | <1 |
| 16 | <1 | 46 | <1 |
| 17 | 1.4 | 47 | <1 |
| 18 | <1 | 48 | <1 |
| 19 | <1 | 49 | <1 |
| 20 | <1 | 50 | 7.1 |
| 21 | <1 | 51 | 2.6 |
| 22 | <1 | 52 | <1 |
| 23 | <1 | 53 | 2.3 |
| 24 | <1 | 54 | 7.4 |
| 25 | <1 | 55 | <1 |
| 26 | <1 | 56 | <1 |
| 27 | 2.3 | 57 | 4.1 |
| 28 | <1 | 58 | 1.7 |
| 29 | 6.9 | 59 | <1 |
| 30 | 4.9 | 60 | 5.3 |

DISCUSSÃO

Atualmente com a melhora dos cuidados com os animais domésticos e o desenvolvimento da Medicina Veterinária, torna-se necessário um aprofundamento no estudo das doenças e estabelecimento de rotina clínica e laboratorial para o diagnóstico destas.

A literatura (32-34) sugere que, devido ao aumento das exigências em biossegurança, se pesquise métodos laboratoriais mais seguros que o radioimunoensaio e com tempo de incubação menor.

Um dos objetivos deste estudo foi testar o método da imunoquimioluminescência, também chamado de quimioluminescência como alternativa ao radioimunoensaio para dosagens de PTH intacto em cães e determinar o intervalo de valores normais por este método. Na medicina (30, 35) este teste está bem fundamentado, apresentando maior sensibilidade que o radioimunoensaio.

No grupo dos cães normais, os valores de PTH intacto encontrados variaram de <1 a 7,4 pg/mL, com 66,7% dos animais apresentando valores abaixo do limite mínimo de detecção do método. Os resultados encontrados demonstram que este método pode não ser eficiente para determinações de valores de PTH intacto em animais com alterações que levem à diminuição da concentração do hormônio, pois corre-se o risco de se obter um valor abaixo do limite do

método. Existe a probabilidade deste método não ter sido eficiente para valores normais por se tratar de um kit composto de dois anticorpos, o anti-PTH 1-34 e o anti-PTH 44-84, o que segundo Feldman (36) não é o ideal para a dosagem em caninos, que deve ser feita pelo uso de anti-PTH 1-34 e anti-PTH 39-84, porém não há no mercado um kit com estas características.

Neste estudo pôde-se testar o método da quimioluminescência como forma de diagnóstico de alterações das paratireóides em substituição ao radioimunoensaio. Mais estudos se fazem necessários para determinar se o método é eficiente ou se existem problemas com as frações de anticorpo utilizados neste kit em especial.

CONCLUSÕES

Os valores de PTH intacto encontrados nos cães sadios utilizados neste estudo demonstram que o método da quimioluminescência pelo kit utilizado pode não apresentar a eficiência necessária para que seja adotado rotineiramente na mensuração de valores normais ou diminuídos do PTH em cães.

REFERÊNCIAS

1. Capen CC, Martin SL. Calcium metabolism and disorders of parathyroid glands. *Vet Clin North Am.* 1977;7:513-48.
2. Klahr S, Slatopolsky E. Toxicity of parathyroid hormone in uremia. *Annu Rev Med.* 1986;37:71-8.
3. Rosol TJ, Capen CC. Pathophysiology of calcium, phosphorus, and magnesium metabolism in animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1996;26:1155-84.
4. Slatopolsky E, Martin K, Hruska K. Parathyroid hormone metabolism and its potential as a uremic toxin. *Am J Physiol.* 1980;239:F1-12.
5. Banks WJ. Sistema endócrino. In: *Histologia veterinária aplicada*. 2aed. São Paulo: Manole; 1992. cap. 25, p.521-45.
6. Chew DJ, Dibartola SP. Diagnóstico e fisiopatologia da moléstia renal. In: *Ettinger EJ. Tratado de medicina interna veterinária*. 3ªed. São Paulo: Manole; 1992. v.4, cap.107, p.1975-2046.
7. Yaphé W, Forrester SD. Renal secondary hyperparathyroidism: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Comp Cont Educ Pract Vet.* 1994;16:173-81.
8. Silverman R, Yalow RS. Heterogeneity of parathyroid hormone clinical and physiologic implications. *J Clin Invest.* 1973;52:1958-71.
9. Albright F, Reifenshtein EC. *The parathyroid glands and metabolic bone disease*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1948.
10. Itakura C, Iida M, Goto M. Renal secondary hyperparathyroidism in aged sprague-dawley rats. *Vet Pathol.* 1977;14:463-9.

11. Lúcio WF, Nogueira RMR, Silva JML, Mello MA, Carvalho CB. Hiperparatireoidismo secundário renal em cão. *Arq Esc Vet Univ Fed Minas Gerais*. 1973;25:59-66.
12. Mclean FC, Urist MR. *Bone fundamentals of the physiology of skeletal tissue*. 3ª ed. Chicago: University of Chicago; 1968.
13. Lamb CR. The double cortical line: a sign of osteopenia. *J Small Anim Pract*. 1990;31:189-92.
14. Kirk RW. *Current veterinary therapy III small animal practice*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1968.
15. Weller RE, Cullen J, Dagle GE. hyperparathyroid disorders in the dog: primary, secondary and cancer-associated (pseudo). *J Small Anim Pract*. 1985;26:329-41.
16. Watson ADJ, Canfield PJ. Renal failure, hyperparathyroidism and hypercalcaemia in a dog. *Aust Vet J*. 1979;55:177-80.
17. Weller RE, Cliver S. Renal secondary hyperparathyroidism. *Mod Vet Pract*. 1981;62:117-20.
18. Werner LL. Renal secondary hyperparathyroidism, fibrous osteodystrophy, and hypocalcemia in a young dog with end-stage kidney disease. *Comp Cont Educ Pract Vet*. 1983;5:195-202.
19. Massry SG, Arieff AI, Coburn JW, Palmieri G, Kleeman CR. Divalent ion metabolism in patients with acute renal failure: Studies on the mechanism of hypocalcemia. *Kidney Int*. 1974;5:437-45.
20. Slatopolsky E, Rutherford E, Hruska K, Martin K, Klahr S. How important is phosphate in the pathogenesis of renal osteodystrophy? *Arch Intern Med*. 1978;138:848-52.
21. Lopez-Hilker S, Galceran T, Chan YL, Rapp N, Martin KJ, Slatopolsky E. Hypocalcemia may not be essential for the development of secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure. *J Clin Invest*. 1986;78:1097-102.
22. Galceran T, Martin KJ, Morrissey JJ, Slatopolsky E. Role of 1,25-dihydroxyvitamin D on the skeletal resistance to parathyroid hormone. *Kidney Int*. 1987;32:801-7.
23. Nissenson RA, Abbott SR, Teitelbaum AP, Arnaud CD. Endogenous biologically active human parathyroid hormone: measurement by a guanyl nucleotide-amplified renal adenylate cyclase assay. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981;52:840-6.
24. Barber PJ, Elliott J. Feline chronic renal failure: calcium homeostasis in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. *J Small Anim Pract*. 1998;39:108-16.
25. Bricker NS, Fine LG. The trade-off hypothesis: current status. *Kidney Int Suppl*. 1978;13:5-8.
26. Massry SG, Goldstein DA. The search for uremic toxin(s) "X" "X" = PTH. *Clin Nephrol*. 1979;11:181-9.

27. Akmal M, Telfer N, Ansari AN, Massry SG. Erythrocyte survival in chronic renal failure. *J Clin Invest.* 1985;76:1695-8.
28. Hansen BH, DiBartola SP, Chew DJ, Brownie C, Nagode L. Clinical and metabolic findings in dogs with chronic renal failure fed two diets. *Am J Vet Res.* 1992;53:326-34.
29. King LG, Giger U, Diserens D, Nagode LA. Anemia of chronic renal failure in dogs. *J Vet Intern Med.* 1992;6:264-70.
30. Morita A, Tabata T, Koyama H, Emoto M, Inoue T, Nishizawa Y, et al. A two-site immunochemiluminometric assay for intact parathyroid hormone and its clinical utility in hemodialysis patients. *Clin Nephrol.* 1992;38:154-7.
31. Petrites-Murphy MB, Pierce KR, Lowry SR, Fischer JW. Role of parathyroid hormone in the anemia of chronic terminal renal dysfunction in dogs. *Am J Vet Res.* 1989;50:1898-905.
32. Lazaretti P, Kogika MM, Hagiwara MK, Lustoza MD, Mirandola RMS. Concentração sérica de paratormônio intacto em cães com insuficiência renal crônica. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2006;58:489-94.
33. Jericó MM, Mendonça BB, Otsuka M, Maganin JRA, Larsson CE. Avaliação da função tireóidea na espécie canina: padronização e comparação entre imunoensaios. In: *Anais do 20º Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais; 1999, Águas de Lindóia. Águas de Lindóia: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais; 1999. p.19.*
34. Garner SC, Leigh GS. Initial experience with intraoperative PTH determinations in the surgical management of 130 consecutive cases of primary hyperparathyroidism. *Surgery.* 1999;126:1132-8.
35. Exner T, Koutts J. Simple immunochromometric assay for protein C activity. *J Lab Clin Med.* 1986;107:405-11.
36. Feldman EC. The parathyroid gland. In: *Feldman EC, Nelson RW. Canine and feline endocrinology and reproduction. 2ªed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. cap.14, p. 454-516.*

Recebido em: 16/06/08

Aceito em: 31/10/12