



Dinâmica da secreção de paratormônio biologicamente ativo em indivíduos normais durante hipocalcemia induzida por EDTA

MARISE LAZARETTI CASTRO¹, TERESA SAYOKO KASAMATSU², REINALDO PERRONE FURLANETTO³, JOSÉ GILBERTO H. VIEIRA³, CARLOS HENRIQUE MESQUITA⁴

INTRODUÇÃO

O principal fenômeno fisiológico que leva a alterações na secreção de paratormônio (PTH) é a variação dos níveis séricos de cálcio. A hipocalcemia desencadeia a liberação de PTH pelas células paratiroideanas normais e pode ser induzida *in vivo* pela infusão de um agente quelador de cálcio, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e usado para a avaliação da resposta secretória das glândulas^(1,4).

O metabolismo do PTH é bastante complexo, e além da forma inteira, de 84 aminoácidos, diversos tipos de fragmentos, predominantemente carboxiterminais, circulam no plasma⁽⁷⁾. A porção biologicamente ativa do PTH está contida na sua seqüência aminoterminal⁽¹⁵⁾, e os ensaios baseados em anticorpos que reconhecem essa porção da molécula reconhecem também as formas biologicamente ativas^(4, 18).

Estudos usando modelos *in vitro*⁽²⁾ ou modelos animais⁽¹²⁾ mostraram que variações dos níveis de cálcio induzem a variações dos níveis de PTH inversamente relacionados e que obedecem a um modelo sigmoidal de secreção. Tal fenômeno ainda não foi bem caracterizado em humanos, principalmente porque a maioria dos estudos de infusão de EDTA se basearam em ensaios de PTH de especificidade predominantemente carboxiterminal^(3, 5, 14).

Nós desenvolvemos um ensaio altamente específico para a porção aminoterminal do PTH⁽¹⁸⁾, que no entanto apresentava uma limitação de sensibilidade (aproximadamente 10pmol/l) que não permitia a medida dos níveis de PTH basais em indivíduos normais, restringindo o uso do referido ensaio para o diagnóstico de condições

de hiperparatiroidismo. Com algumas modificações técnicas descritas neste trabalho, tornamos o ensaio muito mais sensível, e o empregamos para o estudo e padronização da resposta de indivíduos normais à hipocalcemia induzida pela infusão endovenosa de EDTA.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em 10 indivíduos voluntários normais, após estes conhecerem amplamente o procedimento a que seriam submetidos. O protocolo de trabalho havia sido previamente aprovado pelo Comitê de Controle Ético de Pesquisas Clínicas "in Anima Nobili" da Escola Paulista de Medicina. Os indivíduos eram sabidamente saudáveis, não faziam uso de qualquer medicação há pelo menos um mês, sendo que a faixa etária do grupo variou de 26 a 45 anos, sendo sete do sexo feminino e três do sexo masculino. Os testes tiveram início entre 8:00 e 8:30 horas, com duração de 180 min. Durante os primeiros 60 min foram colhidas amostras basais de 10 em 10 min, sendo então iniciada infusão, com bomba de infusão (Harvard Apparatus Compact Infusion Pump), de uma solução de EDTA dissódico (Titrplex III, Merck Indústrias Químicas, Rio de Janeiro) na dose de 30mg/kg/peso, lidocaína 2% (Ceme) na dose de 2,7mg/kg e soro glicosado a 5% em volume suficiente para completar 200ml de solução. Esta solução era infundida a uma velocidade de 1,66ml/min durante os 120 min restantes do teste. Amostras foram colhidas a cada 10 min, sendo o soro separado e armazenado a -20°C até a ocasião das dosagens hormonais e bioquímicas.

As dosagens de cálcio total foram feitas com método colorimétrico (Ca-Color, Wiener Lab. Buenos Aires, Argentina), sendo todas as dosagens feitas em duplicata, e o coeficiente de variação intra-ensaio ob-

tido foi da ordem de 4%. As dosagens de PTH foram feitas utilizando-se um radioensaio aminoterminal específico desenvolvido em nossos laboratórios⁽¹⁸⁾, modificado com o intuito de se conseguir maior sensibilidade. Tais modificações basearam-se no emprego, como traçador, de um peptídeo sintético [Tyri]-hPTH-(1-34), produzido pelo laboratório Bachem Inc., Califórnia, EUA. Tal peptídeo, após marcação com Iodo-125 pela técnica da cloramina T⁽¹⁰⁾, foi purificado num sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em fase reversa (Waters Chromatography Division, Milford, Ma., EUA, modelo 510) com o emprego de uma coluna de *microbondapak* C-18, utilizando como eluente acetonitrila em água em concentrações crescentes (25 a 50%) comandadas por um gerador de gradiente (Solvent Programmer Mod. 660, Waters). Na Fig. 1 está representado um perfil de eluição de uma marcação como a descrita, sendo identificados quatro picos distintos; o estudo dos mesmos mostrou ser o de nº 3 o que apresentou consistentemente maior capacidade de ligação e menor ligação inespecífica. O emprego de tal traçador permitiu a utilização do anti-soro G6 num título final de 1/6.000, cerca de duas vezes superior ao originalmente descrito⁽¹⁸⁾. O método assim modificado apresentou uma dose mínima detectável de 2,4pmol/l, e um coeficiente de variação interensaio da ordem de 7,4% para um soro de valor médio de 8,5pmol/l e de 7,1% para um soro de valor médio de 15pmol/l. O coeficiente de variação intraensaio mostrou-se inferior a 10% para as concentrações de PTH de interesse (3 a 30pmol/l).

Para o ajuste dos dados das curvas padrão dos radioimunoensaios de PTH empregamos um programa logístico de quatro parâmetros, que fornece também o per-

1. Pós-graduanda da Disciplina de Endocrinologia da EPM.
2. Técnica de Laboratório da Disciplina de Endocrinologia da EPM.
3. Professor adjunto da Disciplina de Endocrinologia da EPM.
4. Físico do Ipen.

Pedidos de separata: Dr. José Gilberto H. Vieira — Disciplina de Endocrinologia da Escola Paulista de Medicina — Caixa Postal 20.266 — 04034 — São Paulo-SP.

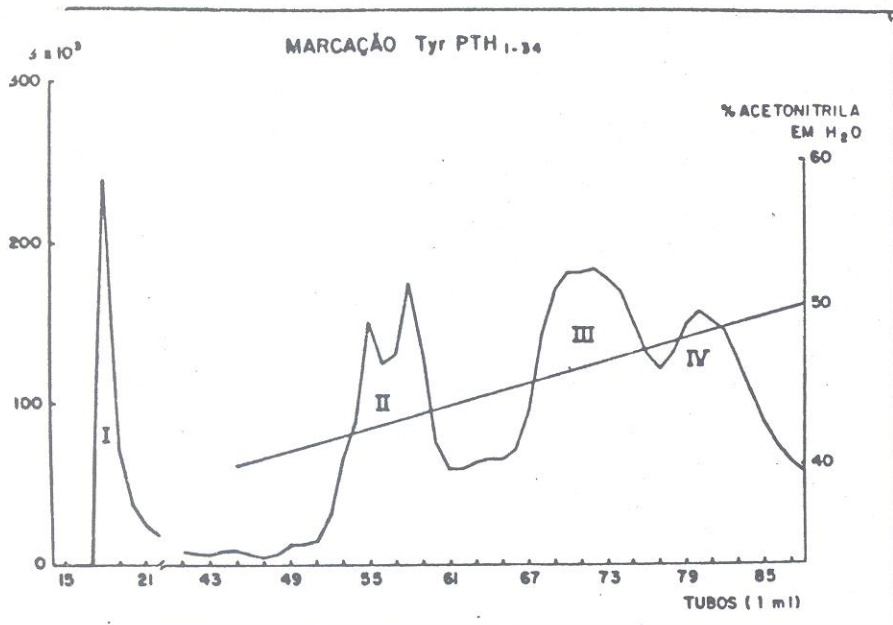


Fig. 1 — Perfil de eluição obtido pela aplicação dos produtos de marcação do peptídeo [Tyr 1]-hPTH-(1-34) com ^{125}I num sistema de HPLC (ver detalhes no texto). A reta que atravessa o perfil representa as concentrações crescentes de acetonitrila. O pico I corresponde ao ^{125}I não-incorporado e o III foi o utilizado no ensaio.

fil de precisão do ensaio⁽¹³⁾. As funções analíticas para ajustamento dos dados das concentrações de cálcio e PTH foram selecionadas empiricamente, procurando-se atender aos compromissos de adequação dos pontos experimentais com a simplicidade algébrica. As expressões adotadas encontram-se representadas e explicadas na Fig. 2, onde, no caso do cálcio, "lambda" representa a constante de decaimento, T representa o tempo relativo da amostragem expresso em minutos e "e" é o número da base dos logaritmos neperianos; no caso do PTH, "alfa" é a constante de incremento da concentração de PTH expressa em minutos e "Q" representa o incremento máximo de PTH desde o valor basal (média das sete amostras basais) até o novo nível assintótico de equilíbrio do PTH durante a infusão contínua de EDTA. Para o estudo das correlações entre os pares de valores de cálcio e PTH utilizamos uma correlação linear.

RESULTADOS

Nas amostras basais obtidas, um total de 70, sendo sete de cada um dos 10 indivíduos, obtivemos valores de PTH que variaram entre 3,4 e 11,4 pmol/l, com média \pm desvio padrão de $6,9 \pm 1,7$ pmol/l. Para o cálcio os valores variaram entre 8,3 e 10,1 mg/dl, com média \pm desvio padrão de $9,3 \pm 0,2$ mg/dl, valores compatíveis com os anteriormente publicados para o método⁽⁵⁾. Não observamos variações significativas nem de cálcio nem de PTH nas amostras basais de cada indivíduo, demonstrando que, pelo menos no tempo estudado, os níveis são estáveis, sem a observação de picos secretórios de PTH. Nenhuma das provas precisou ser interrompida e nenhum voluntário apresentou sintomas consequentes à hipocalcemia provocada. Com exceção de um indivíduo, todos relataram dor no local da infusão, com irradiação até o

cavo axilar, que teve início cerca de 10 min após o início do teste, melhorando após aproximadamente 30 min. Os valores de PTH e cálcio total obtidos durante a infusão de EDTA encontram-se nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. A média do decréscimo do cálcio em relação ao basal foi de $1,8 \pm 0,4$ mg/dl, variando de 1,3 (-14,4%) a 2,5 (-26%) mg/dl. A constante de decaimento "lambda" do cálcio obtido para as médias de tempo foi de -0,001603 e a representação gráfica da equação composta com os dados médios, segundo o modelo matemático já descrito, encontra-se na parte superior da Fig. 3. Quanto aos valores de PTH encontrados durante a infusão de EDTA, encontramos um incremento médio de 141,2%, com variação entre 75 e 229% entre os diferentes indivíduos. A equação composta com os dados médios obtidos, segundo o modelo já descrito, encontra-se na parte inferior da Fig. 3. Calculamos também o chamado T-crítico, ou seja, o tempo

a partir do qual já se evidenciava um aumento significativo dos níveis de PTH, sendo que encontramos uma variação entre 2,4 e 15,8 min, mostrando que em 70% dos indivíduos já se observava uma elevação significativa do PTH na primeira coleta após o início da infusão, isto é, no tempo 10 min. Por ocasião da segunda coleta, aos 20 min, todos os indivíduos já apresentavam elevação significativa dos níveis desse hormônio. Encontramos uma correlação linear significativa ($r = -0,9267$), inversamente proporcional, entre os valores médios de PTH e de cálcio durante a infusão. Essa correlação é expressa pela equação $\text{PTH} = 49,1-4,3 \cdot \text{Ca}$, sendo que, em média, uma queda de 1,0 mg/dl no nível de cálcio correspondeu a uma elevação de 4,3 pmol/l no nível de PTH.

DISCUSSÃO

O uso do EDTA como indutor de hipocalcemia é um método empregado há muitos anos para avaliar a função secretória das glândulas paratiróides^(9, 10, 11). A disponibilidade de um ensaio que mede a porção aminoterminal biologicamente ativa do PTH, de sensibilidade capaz de detectar pequenas alterações secretórias, torna-o o método ideal para a avaliação da resposta de PTH ao fenômeno desencadeado pela infusão de EDTA. As modificações introduzidas no ensaio anteriormente descrito em nosso Serviço⁽¹⁸⁾ o tornaram potencialmente capaz de preencher os requisitos de sensibilidade e especificidade necessários. A introdução do radical tirosina na molécula do peptídeo (1-34)-hPTH permitiu maior facilidade de marcação, sem alterar o reconhecimento do peptídeo pelo anti-soro, desde que o sítio antigênico por ele reconhecido se situa entre os aminoácidos 15 e 26 da sequência^(16, 17). A purificação num sistema de HPLC em fase reversa possibilitou adicionalmente que o peptídeo de interesse fosse obtido numa forma bastante pura, com atividade específica máxima, e estabilidade maior.

Na tentativa de afastar possíveis erros de interpretação caso existissem variações grandes dos níveis basais de PTH, realizamos sete coletas no intervalo de 60 min que precedia o início da infusão e não observa-

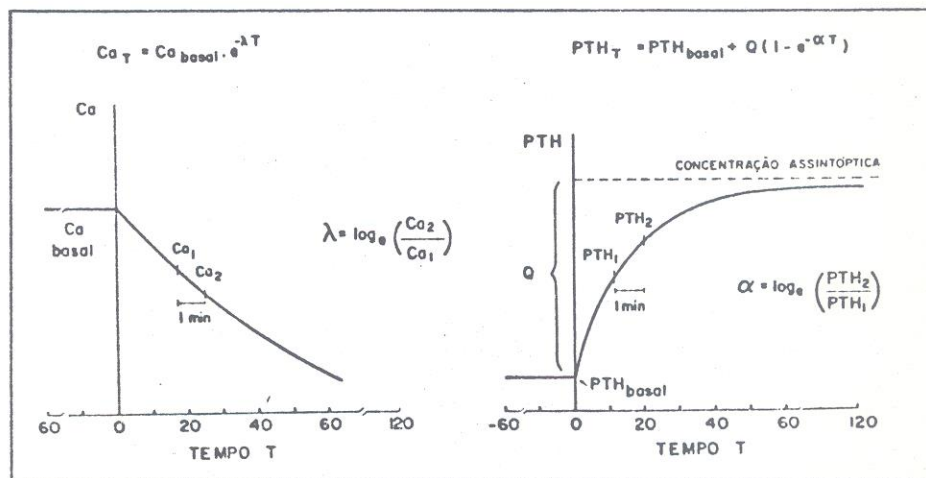


Fig. 2 — Representação dos modelos cinéticos utilizados para o estudo do decaimento do cálcio (esquerda) e o incremento do PTH (direita), como descrito no texto.

TABELA 1
Níveis de PTH aminoterminal obtidos durante infusão de EDTA (pmol/l)

Tempo (min)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Indiv.													
1	4,1	8,5	8,5	9,5	8,5	9,5	13,1	10,2	10,0	9,2	9,5	12,1	8,5
2	7,1	12,1	12,3	12,3	13,8	21,4	16,8	17,9	17,9	17,5	19,7	17,5	20,2
3	6,6	10,4	8,0	10,0	10,4	12,9	11,7	11,4	12,9	13,6	13,1	10,9	13,1
4	4,7	6,8	9,5	8,7	7,8	10,9	11,2	10,4	9,5	11,7	12,4	14,3	15,5
5	6,3	8,5	10,7	10,0	10,4	10,4	11,9	12,1	13,1	13,6	12,6	12,6	13,4
6	6,2	6,1	7,3	9,5	9,0	8,0	9,2	10,0	11,4	10,7	11,4	13,1	13,8
7	7,8	9,9	11,9	12,1	11,6	13,1	11,4	12,9	14,3	13,8	14,1	14,3	12,9
8	7,9	10,7	10,2	11,9	11,2	11,8	12,4	13,8	12,4	12,9	11,9	13,6	12,4
9	10,1	12,6	17,0	20,5	18,5	19,9	19,7	23,1	20,1	18,9	19,2	20,4	22,8
10	8,1	10,0	12,4	16,5	16,7	14,8	15,3	15,3	15,0	17,0	18,7	18,7	18,5
Média	6,9	9,6	10,8	12,1	11,8	13,3	13,3	13,7	13,7	13,9	14,3	14,8	15,1
DP	1,7	2,1	2,8	3,7	3,5	4,3	3,1	4,1	3,3	3,1	3,6	3,1	4,2

TABELA 2
Níveis de cálcio plasmático obtidos durante infusão de EDTA (mg/dl)

Tempo (min)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Indiv.													
1	8,6	8,1	8,1	8,1	8,0	7,9	7,7	7,9	7,9	7,6	7,8	7,3	7,5
2	9,6	9,5	9,5	8,8	9,2	8,4	9,1	8,6	8,7	8,7	8,0	7,9	7,6
3	9,8	9,7	8,8	9,0	9,0	8,4	8,7	8,9	8,7	8,0	8,0	8,1	7,9
4	9,6	9,0	8,2	8,8	8,1	7,9	7,8	8,3	7,6	7,4	7,8	7,9	7,1
5	9,1	9,2	8,4	8,2	8,6	8,3	8,2	7,9	8,2	7,4	7,4	7,3	7,5
6	9,1	9,2	8,3	8,8	8,4	8,4	7,3	9,0	8,1	7,2	8,2	7,3	7,6
7	9,2	8,5	8,9	9,4	8,9	8,6	8,8	8,0	8,0	8,9	7,3	8,2	7,5
8	9,5	9,5	8,6	9,5	8,6	8,5	8,5	8,0	8,8	8,2	8,4	8,2	7,8
9	9,3	9,1	9,4	8,7	8,8	8,8	8,6	9,0	8,6	8,6	7,7	7,9	7,9
10	9,0	9,1	8,8	8,9	8,6	9,0	8,8	8,5	8,6	8,1	7,7	7,8	8,2
Média	9,3	9,1	8,7	8,8	8,6	8,3	8,4	8,3	8,0	7,8	7,8	7,8	7,7
DP	0,3	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3	0,6	0,4	0,4	0,6	0,3	0,4	0,3

mos variações significativas nos níveis hormonais. Tal fato não afasta a possibilidade que elas existam, fato inclusive recentemente relatado⁽⁸⁾, mas que aparentemente não interferiram na interpretação do teste em estudo. O único efeito colateral observado durante a execução dos testes foi a dor no trajeto venoso onde se efetuava a infusão. Tal efeito colateral já era esperado, e a adição de lidocaína à solução infundida visa especificamente tentar contorná-lo, tornando-o suportável, fato que ocorreu em todos os voluntários. A dose de EDTA por nós utilizada (30mg/kg) foi inferior à empregada pelos trabalhos pioneiros^(9, 10, 11), que era de cerca de 50 a 70mg/kg, e que continua sendo empregada até hoje⁽¹⁾. No entanto, pelas características do ensaio empregado para medir PTH, pudemos induzir uma resposta significativa em curto espaço de tempo, isto sem induzir hipocalcemia sintomática em nenhum dos voluntários e tendo provocado uma queda dos níveis de cálcio que não excedeu, em média, a 20% do valor basal. Outro aspecto interessante é a análise do chamado T-crítico, ou o tempo após o início da infusão em que o PTH atinge um valor significativamente maior que o basal, que foi na grande maioria dos indivíduos antes dos 10 min de infusão, antes mesmo que fosse detectável uma queda

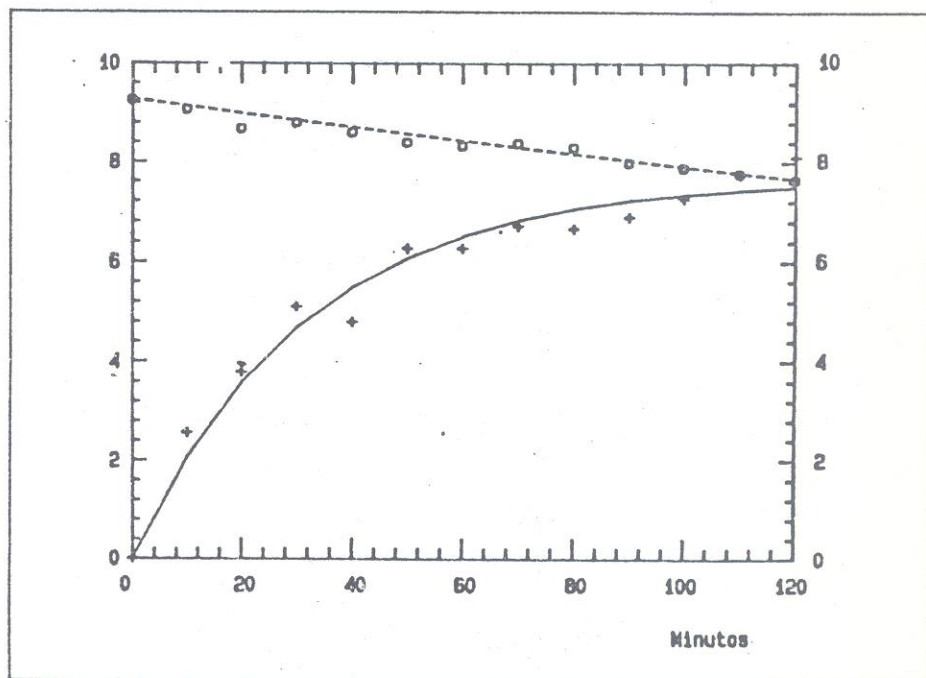


Fig. 3 — Incremento do PTH (+) (linha contínua), em pmol/l, e decréscimo do cálcio (o) (linha tracejada), em mg/dl, em função do tempo ao longo da infusão de EDTA. Cada ponto representa a média de 10 indivíduos.

ativa da calcemia. Isto denota, em primeiro lugar, a grande sensibilidade do radioimunoensaio de PTH empregado, e em segundo lugar indica que provavelmente a fração ionizada do cálcio já teria sofrido decréscimo significativo — simplesmente o método por nós empregado para a medida do cálcio (cálcio total) não foi capaz de discriminá-lo. Provavelmente o uso de um detector de cálcio ionizado permitiria uma melhor avaliação do fenômeno da hipocalcemia induzida e acreditamos ser o método de escolha, quando disponível, para o acompanhamento de testes deste tipo.

A função matemática usada para representar o fenômeno de liberação de PTH enquadrado quase que perfeitamente os dados experimentais obtidos (Fig. 3), comprovando que realmente uma função sigmóide representa bem o fato. Tal achado se coaduna perfeitamente com os dados experimentais obtidos em estudos de secreção de PTH

in vitro⁽²⁾. A definição dos parâmetros de normalidade aqui descritos servirá como base para estudos de função paratiroideana em diferentes populações de interesse, abrindo novas perspectivas de pesquisa e diagnóstico de doenças do sistema osteomineral.

RESUMO

Com o emprego de um radioimunoensaio aminoterminal específico altamente sensível para medir o nível de paratormônio (PTH) biologicamente ativo, estudamos a dinâmica da resposta do PTH em resposta à hipocalcemia induzida pela infusão de EDTA (30mg/kg/h) em 10 indivíduos normais. Os dados obtidos mostraram um incremento máximo médio do nível de PTH sérico de 141,2% e uma correlação significativa entre a hipocalcemia induzida e o incremento de PTH. Os dados obtidos obe-

decem a um modelo sigmoidal de resposta, e servirão como base para o uso do teste funcional em pesquisa e diagnóstico.

SUMMARY

Using an highly sensitive amino-terminal specific radioimmunoassay to measure bioactive parathyroid hormone (PTH), we studied the dynamics of the PTH response to EDTA (30mg/kg/h) induced hypocalcemia in 10 normal subjects. The data obtained showed a mean maximal increment of the PTH levels of 141.2% and a significant correlation between the induced hypocalcemia and the PTH increment. The data obtained fitted well in a sigmoidal model, and will be used as reference for the application of the EDTA infusion test in research and diagnosis.

REFERÊNCIAS

1. BENSON, L. & RASTAD, J. *et al.* — Stimulation of parathyroid hormone secretion by EDTA infusion — a test for the differential diagnosis of hypercalcaemia. *Acta Endocrinol.*, 111:498-506, 1986.
2. BROWN, E.M. — Four parameter model of the sigmoidal relationship between parathyroid hormone release and extracellular calcium concentration in normal and abnormal parathyroid tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56:572-581, 1983.
3. BURCKHARDT, P.; TSCHOLL-DUUCOMMUN, J. & RUEDI, B. — Parathyroid response to EDTA in hypoparathyroidism and in tetany. *Acta Endocrinol.*, 94:340-353, 1980.
4. DESPLAN, C.; JULLIENNE, A. *et al.* — Sensitive assay for the biologically active fragment of human parathyroid hormone. *Lancet*, 2:198-199, 1977.
5. DEUXCHAISNES, C.M.; ROMBOUTS-LINDEMANS, C. *et al.* — Testing for hypoparathyroidism. *N. Engl. J. Med.*, 18:140, 1979.
6. GREENWOOD, F.C.; HUNTER, W.M. & GLOVER, J.S. — The preparation of ¹³¹I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 114:23, 1963.
7. HABENER, J.F.; MAYER, G.P. *et al.* — Metabolism of amino and carboxyl-sequence immunoreactive parathyroid hormone in the bovine: evidence for the peripheral cleavage of hormone. *Metabolism*, 25:385-395, 1976.
8. HARMS, H.; KAPTAINA, U. *et al.* — The pulse amplitude and frequency modulation of PTH secretion in man. In: Chistianen, C. (ed.) — *Osteoporosis 1987*. Copenhagen, Osteopress, 1987. p. 723-724.
9. JONES, K.H. & FOURMAN, P. — Edetic-acid test for parathyroid insufficiency. *Lancet*, 2:119-120, 1963.
10. KING, L.R.; PORTNOY, R.M. & GOLDSMITH, R.E. — Serum calcium homeostasis following thyroid surgery as measured by ethylenediamine tetra-acetate infusion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 25:577-584, 1965.
11. KLOTZ, H.P. & WITCHITZ, S. — Le test d'hypocalcémie provoquée par l'EDTA-Na2 dans la spasmophilie constitutionnelle. *Sem. Hop. Paris*, 39:2493-2496, 1963.
12. MAYER, G.P. & HURST, J.G. — Sigmoidal relationship between parathyroid hormone secretion rate and plasma calcium concentration in calves. *Endocrinology*, 102:1036-1042, 1978.
13. MESQUITA, C.H. — *Elaboração e avaliação do desempenho de programa computacional destinado ao controle de qualidade de ensaios radioligantes. Aplicação ao radioimunoensaio de insulina*. Mestrado. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1983.
14. PARFITT, A.M. — Study of parathyroid function in man by EDTA infusion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29:569-580, 1969.
15. POTTS JR., J.T.; TREGGAR, G.W. *et al.* — Synthesis of a biologically active N-terminal tetratriacontapeptide of parathyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:63-67, 1971.
16. VIEIRA, J.G.H.; FEDERICO, P. *et al.* — Characterization of a high affinity antiserum specific for the amino-terminal sequence of human parathyroid hormone. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 20:721-729, 1987.
17. VIEIRA, J.G.H. & NEER, R.M. — Identification of an antigenic determinant in the amino-terminal sequence of parathyroid hormone. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 20:791-793, 1987.
18. VIEIRA, J.G.H.; OLIVEIRA, M.A.D. *et al.* — Development of an homologous radioimmunoassay for the synthetic amino terminal (1-34) fragment of human parathyroid hormone using egg yolk-obtained antibodies. *J. Immunoassay*, 7:57-72, 1986.