



CONTROVERSIAS / Controversies

CONTROVERSIAS EN LA MEDICIÓN DE PARATHORMONA

Erich Fradinger*

Instituto de Investigaciones Metabólicas, Buenos Aires, República Argentina.

Resumen

La parathormona es una proteína de 84 aminoácidos, muy importante en el diagnóstico de hipocalcemia o hipercalcemia, hiperparatiroidismo e hipoparatiroidismo y en el seguimiento de la patología ósea en pacientes renales, etc. Si bien el primer ensayo fue publicado en 1963, aún hoy su medición en el laboratorio es un desafío parcialmente resuelto. Entre los tantos problemas podemos mencionar los fragmentos circulantes que son reconocidos por ensayos de segunda generación, la distinta especificidad de los anticuerpos ante estos fragmentos, la falta de un método de referencia, de estandarización de los ensayos y de definición de cuál debe ser la población ideal para definir un rango de referencia. Se requiere un avance en todos estos aspectos para que los ensayos sean comparables. A su vez, es muy importante que los médicos conozcan estos problemas y los usen como herramientas para la interpretación de un resultado. Es esencial que los laboratorios implementen estrictos procedimientos de control de calidad interno y su participación en un control de calidad externo para evaluar su *performance* con respecto a sus propias metodologías en relación a otras. **Palabras clave:** controversias, medición, parathormona.

Summary

CONTROVERSIES IN MEASURING PARATHYROID HORMONE

Parathyroid hormone is a 84 aminoacid protein very important in the diagnosis of hypocalcemia and hypercalcemia, hyper and hypoparathyroidism and in the follow up of bone disorders in renal patients. Although the first assay was published in 1963, even today its measurement in the laboratory is a partially-resolved challenge. Common problems are circulating fragments that are recognized by second-generation assays, the different specificity of antibodies, the lack of a reference method, the lack of assay standardization and the lack of definition about which is the ideal population to define a normal reference range. Improvements in all of these aspects are required to make assays comparable. It is important that physicians know these aspects and use them as tools to interpret one results. It is essential that laboratories implement strict internal quality control procedures and participation in external quality assessment schemes to evaluate the performance among different methods.

Key words: *controversies, measure, parathyroid hormone.*

* Dirección postal: Instituto de Investigaciones Metabólicas, Libertad 836, 1er piso, 1012 Buenos Aires, República Argentina. Correo electrónico: efradinger@idim.com.ar

La parathormona (PTH) es una proteína de 84 aminoácidos codificada en el cromosoma 11p y producida por la glándula paratiroidea. Se sintetiza como una preproPTH (115 aminoácidos) que por enzimas específicas, se cliva a una proPTH y finalmente a PTH. Su vida media en circulación es muy corta (2-4 min) y su metabolismo es principalmente hepático, si bien el riñón también metaboliza la hormona intacta y algunos fragmentos.

Son bien conocidas las acciones sobre órganos clásicos del metabolismo fosfocálcico: en el riñón es hipocalciúrica, hiperfosfática y estimula la enzima 1-alfa-hidroxilasa (CYP27B1) que sintetiza la 1,25-dihidroxitamina D.

En el hueso es una hormona osteoclastogénica por aumento de expresión de RANKL osteoblástico y disminución de la síntesis de esclerostina en osteocito.

Ensayos de primera generación

El primer ensayo fue un radioinmunoensayo (RIA) y data de 1963. Desarrollado por Berson y Yalow,¹ usaron anticuerpos policlonales de cobayo y conejo dirigidos contra PTH bovina. En los siguientes años se desarrollaron otros ensayos con anticuerpos dirigidos principalmente a fragmentos carboxilo terminal y fragmentos medios de la molécula (Figura 1). Tenían como principal desventaja la inespecificidad (por el uso de un solo anticuerpo) y la retención de fragmentos en pacientes con filtrado glomerular bajo. En nuestro medio fue muy conocido el ensayo desarrollado por el Dr. Slatopolsky con un anticuerpo (CH9) cuya curva de calibración se realizaba con el fragmento “molécula media” y fue muy utilizado en la década de 1980 hasta la aparición de los ensayos de segunda generación.

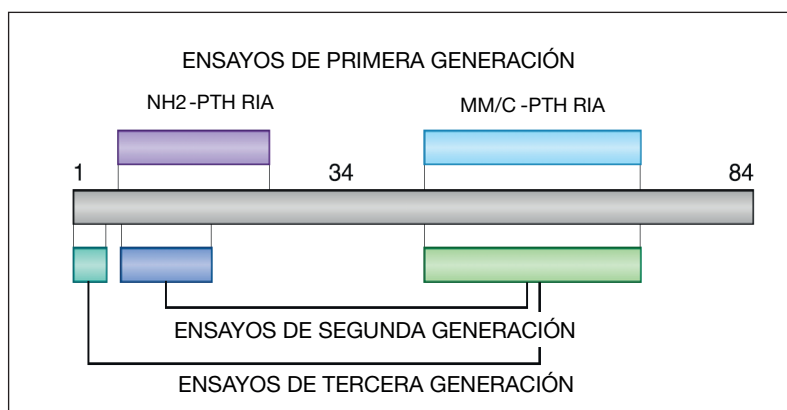


Figura 1. Los distintos anticuerpos dirigidos a la molécula de PTH en los ensayos de primera, segunda y tercera generación. Modificado de Garrett G, Sardiwal S, Lamb EJ, Goldsmith DJ. PTH- A particularly tricky hormone: why measure it at all in kidney patients? *Clin Am Soc Nephrol* 2013; 8:299-312.

Ensayos de segunda generación

Estos ensayos inmunorradiométricos (IRMA) incorporaron un segundo anticuerpo que confería mayor especificidad y sensibilidad. El primer anticuerpo (de captura) fue dirigido a la región C-terminal (entre aminoácidos 34-84) y el segundo anticuerpo (de detección) a la región N-terminal (entre

aminoácidos 15-32) (Figura 1). El primero de estos ensayos comerciales fue el Allegro PTH (*Nichol's Institute*)² y luego distintos proveedores desarrollaron sus anticuerpos y automatizaron sus plataformas con detección por quimioluminiscencia primero y luego por electroquimioluminiscencia. Es importante destacar que con el ensayo Allegro se publicó el rango de referencia de PTH (10-65 pg/ml)



más frecuentemente citado durante años y con el que también se desarrollaron las normas de la *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI), hoy reemplazadas por las normas *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO).

Durante décadas se utilizaron y aún se utilizan los ensayos de segunda generación, comercializados con el argumento de mayor especificidad para PTH intacta (1-84). Pero en 1992 se publicó un importante trabajo que mostró que el nivel de PTH en pacientes con enfermedad renal crónica no se correlacionaba con la patología que la biopsia ósea revelaba en esos pacientes.³ Es decir que, en ciertos casos, la PTH de segunda generación sobrestimaba el problema óseo que realmente existía. Al poco tiempo, Lepage y cols.⁴ demostraron que estos ensayos, además de dosar PTH 1-84, también dosaban fragmentos (entre ellos un fragmento inactivo 7-84). Vale decir que los médicos recibían (y reciben actualmente) en los informes de laboratorio un valor numérico que representa PTH “intacta” sumada a otros fragmentos.

Ensayos de tercera generación

Para resolver el problema del cruzamiento con el fragmento 7-84 desarrollaron el segundo anticuerpo dirigido a la porción más distal del NH₂ terminal (entre aminoácidos 1-4). El primer ensayo fue comercializado por Scantibodies Lab Inc.^{5,6} Se lo llamó “whole” PTH (PTH bioactiva 1-84) y además con el kit se podía también medir PTH con un ensayo de segunda generación. La diferencia entre las PTH de ambos ensayos era aproximadamente la cantidad de fragmento 7-84 que el paciente tenía en circulación. Los resultados del primer ensayo de tercera generación mostraron que el cruzamiento con 7-84 oscilaba entre 40-60%, por lo que el rango de referencia de este ensayo cambió sustancialmente (rango 5-31 pg/ml). El cociente entre la PTH bioactiva/PTH de segunda generación en sujetos normales,

hemodializados, con hiperparatiroidismo primario, siempre resultó menor de 1, hasta que se descubrió una excepción a estos casos: los pacientes con carcinoma paratiroideo presentaban un cociente PTH bioactiva/PTH de segunda mayor de 1.⁷ Esto se debe a una forma molecular llamada “amino PTH” (modificada probablemente en serina 17) que se “sobreprduce” en estos pacientes. Los ensayos de tercera generación cruzan con esta forma molecular (no así los de segunda), por lo que la relación está invertida y es mayor de uno.⁸

Posteriormente, varias empresas desarrollaron sus anticuerpos propios y automatizaron sus plataformas, primero con detección por quimioluminiscencia y luego por electroquimioluminiscencia. Recientemente se ha publicado un trabajo donde se comparan los dos ensayos comerciales de tercera generación más conocidos, en el cual se observa en el gráfico Bland-Altman una clara diferencia entre ambos en distintas concentraciones. Hasta 200 pg/ml, el sesgo es en promedio 20 pg/ml, mientras que en concentraciones mayores de 200 pg/ml el “bias” aumenta significativamente.⁹ Si bien ambos ensayos son de tercera generación, estas diferencias pueden deberse a la calibración de los ensayos, los efectos de matriz o la especificidad de los anticuerpos, como se explica más adelante.

¿Ensayos de cuarta generación?

Es bien conocido el metabolismo de la PTH. Se sabe que se oxida en la metionina-8 y 18 y que la PTH oxidada es inactiva ya que no puede reconocer al receptor PTH1R. En un elegante diseño, Hocher y cols.¹⁰ desarrollaron un método para separar por cromatografía de afinidad la PTH oxidada (inactiva) de la PTH no oxidada (activa). Al medir la PTH no oxidada (posterior a su separación de la oxidada) con ensayos convencionales resultó que esta circula en concentraciones muy inferiores a las esperadas: $7,7 \pm 1,55$ pg/ml (media ± 1 desvío estándar) con rango de 5 a 14 pg/ml).

Quiere decir que la PTH activa circulante es en promedio 4 veces menor que lo que usualmente medimos en el laboratorio. Queda preguntarse si realmente será necesario medir PTH activa mediante este método (incómodo), ya que cada muestra debe ser pasada por una columna cromatográfica y después ensayada por inmunoensayo.

Ensayos por cromatografía líquida/espectrometría de masa (LC-MS/MS)

Se han publicado dos métodos que utilizan esta técnica, con el fin de alcanzar la posibilidad de desarrollar un método de referencia para PTH.^{11,12} Estos métodos realizan extracción por inmutafinidad y posterior digestión y cuantificación por LC-MS/MS. Son métodos muy promisorios desde lo analítico pero aún tienen algunos problemas: el tratamiento previo de cada muestra y las variantes moleculares de PTH (fosforilada en serina-17 y oxidada en metionina-18) no pueden ser distinguidas (separadas) con estos métodos.

Comparación entre métodos

Durante dos décadas se han publicado gran cantidad de trabajos en los cuales se comparan distintos ensayos de PTH.¹³⁻¹⁹ Las discrepancias entre los ensayos no difieren demasiado, independientemente del año de la publicación, y enfatizan la importancia de estas variaciones al evaluar pacientes con enfermedad renal crónica: un paciente podría ser evaluado de manera distinta con respecto a las guías KDIGO dependiendo del ensayo utilizado, y por ende recibir un tratamiento no adecuado.¹⁵ Los diferentes anticuerpos confieren distinta especificidad ya que tienen distinto cruzamiento con el 7-84 y otros fragmentos. Esto en pacientes renales se hace más evidente y los valores de un ensayo pueden duplicar al de otro. Un tema para considerar es la presencia de anticuerpos heterófilos. Los ensayos pueden interferir por presencia

de anticuerpos (anticobayo u otros) en el suero humano. En general, estos dan interferencias positivas y valores de PTH altos. Ante muestras sospechosas, tal problema puede resolverse con bloqueantes (comerciales) de esos anticuerpos.

Los estándares que usan los proveedores de reactivos difieren entre sí. Existe un Estándar de Referencia Internacional (IS 95/646) que podría mejorar la comparabilidad entre distintas marcas. Para esto es necesario que las empresas calibren sus inmunoensayos contra este estándar. Hasta la fecha de la escritura de este artículo, ninguna empresa tiene el ensayo calibrado contra este estándar, con excepción de un ensayo de 3ª generación.⁹

Participo del Programa de Control Externo NEQAS desde hace 10 años y regularmente se ven las diferencias entre los distintos ensayos, muy similares a las publicadas.¹⁵ Este Programa NEQAS envía rutinariamente pruebas de recuperación con PTH sintética y con el IS 95/646 y los resultados demuestran claramente los problemas de estandarización: se observan en algunos ensayos porcentajes de recuperación mayores de 200% (observación personal). Un estudio reciente compara dos ensayos de tercera generación antes y después de una recalibración con IS 95/646.²⁰ La variabilidad entre los ensayos disminuye significativamente y, más aún, los rangos de referencia entre ambos se hacen comparables.

Variabilidad biológica

La variabilidad intraindividual (CVi) cuando se utilizan ensayos de segunda generación promedia un 25%.²¹ En algunos estudios más recientes con ensayos de tercera generación, el CVi promedia un 30%.²² Estos valores son muy importantes ya que establecen un mínimo cambio significativo para la PTH de más del 70%, lo que dificulta la interpretación de una sola medición de PTH. En pacientes hemodializados, los valores de CVi son más elevados.



Rango de referencia

Es muy importante mencionar que al día de hoy no existe un consenso acerca de cuál debe ser la muestra poblacional ideal para establecer el rango de referencia de PTH. El rango de referencia del kit Allegro (*Nichol's Institute*) no tomó en consideración el estado nutricional de la vitamina D. Se ha sugerido que el límite superior normal de PTH es hasta un 35% menor si se excluyen los individuos con 25-hidroxivitamina D bajos.²³ En un trabajo más reciente se comparan los rangos de refe-

rencia propuestos en los insertos de 10 kits comerciales y los rangos de referencia obtenidos en una población de "referencia": 25-hidroxivitamina D mayor de 30 ng/ml, *clearance* mayor de 60 ml/min, calcio y fósforo normales.²⁴ Se demuestra de manera concluyente que, con algunas marcas comerciales, el límite superior normal de PTH es inferior al propuesto en el inserto pero en otros no (Tabla 1). A pesar de estas diferencias, usando el rango de referencia de la población repleta de vitamina D se mejora la clasificación de los pacientes hemodializados de acuerdo con las guías KDIGO.

Tabla 1. Rangos de referencia según el proveedor y obtenidos en población de referencia: vitamina D > 30 ng/ml, *clearance* mayor de 60 ml/min, calcio y fósforo normal. Adaptado de Ref. 24

Ensayo	Rango de referencia del proveedor (pg/ml)	Límites de referencia (95% de IC) en población de referencia (pg/ml)
1	15,0 - 68,3	16,3 (14,1 - 18,5) - 64,7 (62,5 - 67,0)
2	12 - 88	10,1 (8,4 - 11,8) - 47,4 (45,7 - 49,1)
3	13 - 54	7,2 (5,9 - 8,6) - 35,7 (34,3 - 37,0)
4	17,3 - 72,9	21,3 (19,4 - 23,2) - 68,2 (66,2 - 70,1)
5	7,5 - 53,5	10,8 (9,1 - 12,6) - 47,5 (45,8 - 49,2)
6	15 - 65	13,7 (12,0 - 15,4) - 50,2 (48,4 - 51,9)
7	14 - 66	7,8 (5,8 - 9,8) - 49,7 (47,8 - 51,7)
8	12 - 65	5,4 (3,0 - 8,1) - 57,1 (51,1 - 74,6)
9	5,5 - 38,4	4,6 (3,6 - 5,6) - 25,8 (24,8 - 26,8)
10	5 - 39	6,8 (5,7 - 7,9) - 30,8 (29,6 - 31,9)

Avances importantes

La *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) ha establecido un Grupo de Trabajo (*Working group*) con objetivos de corto y largo plazo: preparar recomendaciones óptimas en la fase preanalítica, recomendar las unidades en las que se debe expresar la PTH (pg/ml o pM), sugerir de manera urgente a la

industria la calibración de los ensayos contra el IS 95/646, desarrollar procedimientos de medición de referencia para la PTH y preparar un panel de muestras de referencia (en plasma), entre otros.²⁵ Luego de una muy importante revisión se sugiere como muestra óptima para PTH la sangre recolectada en tubos con EDTA ya que es más estable que en suero.²⁶ Se recomienda la separación del plasma dentro de las 24 horas de la extracción y guardarlo

a 4 °C con el proceso analítico dentro de las 72 horas de extraída la muestra. La gran desventaja de estas recomendaciones es que la muestra extraída con EDTA no sirve para medir calcio. Y hay que tener especial cuidado en el rango de referencia, ya que para algunos proveedores es distinto para plasma que para suero. Estas recomendaciones no implican que el suero no se pueda utilizar. La centrifugación en estos casos debe ser inmediata y no dejar el suero a temperatura ambiente por más de 2 horas.

Conclusiones

El proceso de mejora de los ensayos de PTH es más lento que el que se realiza para otros analitos con problemas analíticos similares, como por ejemplo la 25-hidroxivitamina D.²⁷ Es evidente y lógico pensar que en el futuro se medirá PTH solo con ensayos de tercera generación por el simple hecho de que en estos ensayos ya no estamos midiendo

el fragmento 7-84. Sin embargo, las últimas Guías para el manejo del hiperparatiroidismo asintomático sugieren claramente que los ensayos de segunda y tercera generación tienen la misma sensibilidad en el diagnóstico de hiperparatiroidismo primario, por lo cual los de segunda generación continuarán en uso hasta que las empresas proveedoras decidan no comercializarlos más.²⁸ Al evaluar un resultado de PTH es importante que el médico tenga en cuenta todas las variables que aquí se han descrito e intentar siempre hacer el seguimiento del paciente en el mismo laboratorio.

Sin embargo, ante un resultado dudoso, se sugiere establecer el diálogo con el bioquímico ya que se siempre se puede ensayar la PTH con otra metodología.

Conflicto de intereses: el autor no presenta conflicto de intereses.

(Recibido: junio 2015.
Aceptado: julio 2015).

Referencias

1. Berson SA, Yalow RS, Aurbach GD, Potts JT. Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963; 49:613-7.
2. Nussbaum SR, Zahradnik RJ, Lavigne JR, et al. Highly sensitive two-site immunoradiometric assay of parathryn, and its clinical utility in evaluating patients with hypercalcemia. *Clin Chem* 1987; 33:1364-7.
3. Quarles LD, Lobaugh B, Murphy G. Intact parathyroid hormone overestimates the presence and severity of parathyroid-mediated osseus abnormalities in uremia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:145-50.
4. Lepage R, Roy L, Brossard JH, et al. A non-(1-84) parathyroid hormone circulating fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic patients. *Clin Chem* 1998; 44:805-9.
5. John MR, Coolman WG, Gao P, Cantor T, et al. A novel immuoradiometric assay detects full-length human PTH but not amino-terminally truncated fragments: implications for PTH measurements in renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4287-90.
6. Gao P, Scheibel S, D'Amour P, et al. Development of a novel immunoradiometric assay exclusively for biologically active whole parathyroid hormone 1-84. Implications for improvement of accurate assessment of parathyroid function. *J Bone Miner Res* 2001; 16:605-14.
7. Cavalier E, Daly A, Betea D, et al. The ratio of parathyroid hormone as measured by third- and second-generation assays as a marker for parathyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:3745-49.
8. Rubin M, Silverberg S, D'Amour P, et al. An N-terminal molecular form of parathyroid hormone (PTH) distinct from hPTH (1-84) is overproduced in



- parathyroid carcinoma. *Clin Chem* 2007;53:1470-6.
9. Hecking M, Kainz A, Bielez B, et al. Clinical evaluation of two novel biointact PTH (1-84) assays in hemodialysis patients. *Clin Biochem* 2012; 45:1645-51.
 10. Hocher B, Oberthur D, Slowinski T, et al. Modeling of oxidized PTH (oxPTH) and non-oxidized PTH (non-oxPTH) receptor binding and relationship of oxidized to non-oxidized PTH in children with chronic renal failure, adult patients on hemodialysis and kidney transplant recipients. *Kidney Blood Press Res* 2013; 37:240-51.
 11. Kumar V, Barnidge DR, Chen LS, et al. Quantification of serum 1-84 parathyroid hormone in patients with hyperparathyroidism by immunocapture in situ digestion liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2010; 56:306-13.
 12. Lopez MF, Rezaei T, Sarracino DA, et al. Selected reaction monitoring-mass spectrometric immunoassay responsive to parathyroid hormone and related variants. *Clin Chem* 2010; 56:281-90.
 13. Souberbielle JC, Boutten A, Carlier MC, et al. Inter-method variability in PTH measurement: implication for the care of CKD patients. *Kidney Int* 2006; 70:345-50.
 14. Cantor T, Yang Z, Caraianni N, Ilamathi E. Lack of comparability of intact parathyroid hormone measurements among commercial assays for end-stage renal disease patients: implications for treatment decisions. *Clin Chem* 2006;52:1771-6.
 15. Almond A, Ellis A, Walker SW, et al. Current PTH immunoassays do not adequately meet the needs of patients with chronic kidney disease. *Ann Clin Biochem* 2011; 1-5.
 16. Sukumar D, Shapses S, Partridge C et al. Inter-variability among serum intact parathyroid hormone assays: a need for standardization. *Osteoporos Int* 2008; 12:1805-6.
 17. Joly D, Druke T, Alberti C, et al. Variation in serum and plasma PTH levels in second-generation assays in hemodialysis patients: A cross-sectional study. *Am J Kidney Dis* 2008; 6:987-95.
 18. Eddington H, Hudson J, Oliver R, et al. Variability in parathyroid hormone assays confounds clinical practice in chronic kidney disease patients. *Ann Clin Biochem* 2014; 51:228-36.
 19. Tan K, Ong L, Seth S, et al. Comparison of the Elecys PTH (1-84) assay with four contemporary second generation intact PTH assays and association with other biomarkers in chronic kidney disease patients. *Clin Biochem* 2013; 46:781-6.
 20. Cavalier E, Delanaye P, Lukas P, et al. Standardization of Diasorin and Roche automated third generation PTH assays with an International Standard. Impact on clinical populations. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52:1137-41.
 21. Vijoen A, Singh D, Patrick J, et al. Analytical quality goals for parathyroid hormone based on biological variation. *Clin Chem Lab Med* 2008; 10:1438-42.
 22. Gardham C, Stevens P, Delaney M, et al. Variability of parathyroid hormone and other markers of bone mineral metabolism in patients undergoing hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5:1261-67.
 23. Souberbielle JC, Cormier C, Kindermans C, et al. Vitamin D status and redefining serum PTH reference range in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3086-90.
 24. Cavalier E, Delanaye P, Vranken L et al. Interpretation of serum PTH concentrations with different kits in dialysis patients according to the KDIGO guidelines: importance of the reference (normal) values. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27:1950-6.
 25. Sturgeon C, Sprague S, Metcalfe W. Variation in parathyroid hormone immunoassay results: a critical governance issue in the management of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26:3440-45.
 26. Hanon E, Sturgeon C, Lamb E. Sampling and storage conditions influencing the measurement of parathyroid hormone in blood samples: a systematic review. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51:1925-41.
 27. Fradinger E. Controversias en la medición de vitamina D. *Actual. Osteol* 2014; 10:85-90.
 28. Bilezikian JP, Brandi ML, Eastell R, et al. Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: Summary statement from the Fourth International Workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:3561-9.