

Puesta al día: pruebas de laboratorio en Endocrinología y Nutrición

BONE METABOLISM. VITAMIN D AND PARATHYROID HORMONE

Vitamin D is a hormone involved in a complex endocrine system that regulates mineral homeostasis, protects the integrity of the skeleton, and modulates growth and cellular differentiation in a wide variety of tissues. Calcidiol, or 25-hydroxivitamin D₃ (the more abundant circulating form of vitamin D), is synthesized in the liver, and calcitriol, or 1- α ,25-dihydroxivitamin D₃ (the biologically more active form), is synthesized in the kidney. The concentration of calcidiol is the most reliable index for defining vitamin D deficiency, insufficiency, hypovitaminosis, sufficiency and toxicity. It is mainly quantified by radioimmunoassay (RIA) methods, although ELISA and chemoluminescence are being strongly introduced in the market. Calcitriol quantification methods usually consist of RIA with immunoextraction. It is important to highlight that to accurately define vitamin D levels in a community, a standardized method of quantification and specific reference values are required. Parathyrin (PTH) is the most important regulator in calcium homeostasis, since it promotes calcium reabsorption in the renal tubules, increasing calcium concentrations in blood. There are several different molecular forms in the circulation with distinct tissular origin, half life, purpose, and involvement in disease. Indeed, knowledge of this heterogeneity is what has enabled results from methods that quantify different regions of the molecule to be interpreted. Currently, second generation immunometric (sandwich) methods are used to quantify PTH, so that the presence of long chain N-terminal peptides appearing in some stages of renal insufficiency can be obviated. PTH concentrations have a marked circadian rhythm and consequently sample extraction after 7 am is advisable, and, theoretically, extraction after 10 am could discriminate between the normal population and that with mild primary hyperparathyroidism. PTH determination has been introduced as a standardized test in open parathyroidectomy and thyroidectomy. In the first case, reductions of 50% with respect to the basal value represent surgical success; in the second case, patients at risk for hypocalcemia can be selected.

Key words: Vitamin D. Calcidiol. Calcitriol. Parathyrin. PTH.

Metabolismo óseo. Vitamina D Y PTH

M.A. NAVARRO-MORENO Y P. ALÍA-RAMOS

Sección de Bioquímica Hormonal y Génica. Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.

La vitamina D es una hormona involucrada en un complejo sistema endocrino que regula la homeostasis mineral, protege la integridad del esqueleto y modula el crecimiento y la diferenciación celular en una amplia variedad de tejidos. El hígado y el riñón son los órganos donde se producen el calcidiol o 25-hidroxivitamina D₃ (forma circulante de vitamina D más abundante) y el calcitriol o 1- α ,25-dihidroxivitamina D₃ (la forma biológicamente más activa), respectivamente. La concentración de calcidiol es el índice más fiable para definir las situaciones de déficit, insuficiencia, hipovitaminosis, suficiencia y toxicidad de vitamina D. Su cuantificación se realiza mayoritariamente por métodos de RIA, aunque se están introduciendo con fuerza en el mercado los de ELISA y quimioluminiscencia; por su parte, los métodos para cuantificar calcitriol son de RIA con immunoextracción. Hay que destacar que para establecer una correcta definición del umbral exacto de la situación de vitamina D, en una comunidad, se necesita tener un método de cuantificación bien estandarizado y con valores de referencia propios.

La paratirina (PTH) es el regulador más importante en la homeostasis del calcio, ya que potencia su reabsorción en el túbulo renal, haciendo que se incremente su concentración sanguínea. En la circulación existen formas moleculares diferentes y de procedencia tisular, vida media, destino y afección en la enfermedad variadas; precisamente el conocimiento de esta heterogeneidad es el que ha permitido poder interpretar resultados procedentes de métodos que cuantifican diferentes regiones de la molécula. Actualmente se usan métodos inmunométricos (sándwich) de segunda generación para cuantificarla, por lo que se puede obviar la presencia de péptidos de cadena larga de la región aminoterminal que se metabolizan en algunos estadios de la insuficiencia renal. La concentración de paratirina tiene un marcado ritmo circadiano, por lo que se aconseja la toma de muestra no antes de las 7 de la mañana y, en sentido académico, una extracción después de las 10 h de la mañana podría discriminar entre población normal e hiperparatiroidismo primario leve.

La PTH se ha introducido como prueba protocolizada en campo operatorio abierto en paratiroidectomía y tiroidectomía. En el primer caso, descensos de un 50% respecto a su valor basal representan éxito quirúrgico; en el segundo caso, se pueden seleccionar pacientes con riesgo de hipocalcemia.

Palabras clave: Vitamina D. Calcidiol. Calcitriol. Paratirina. PTH.

Correspondencia: Dr. M.A. Navarro Moreno.
Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario de Bellvitge.
Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.
Correo electrónico: manavarro@csub.scs.es

Manuscrito recibido el 16-3-2005 y aceptado para su publicación el 5-4-2005.

VITAMINA D

La deficiencia de vitamina D en los niños fue epidémica en la mayoría de las ciudades industrializadas de Europa y Estados Unidos al final del siglo XIX, y el conocimiento del papel de la vitamina D y la luz solar en la prevención y cura del raquitismo supuso uno de los impactos más importantes en el área de salud. El descubrimiento de Steenbock y Black¹, en 1924, que demostró que si se irradiaban con luz solar tanto los alimentos como las sustancias solubles extraídas de las grasas de tejidos animales se podían obtener de ellos grandes cantidades de vitamina D, permitió la obtención y la caracterización de la vitamina D y, como consecuencia, el raquitismo dejó de ser un problema social. Durante la segunda mitad del siglo XX se demostró que la vitamina D era una prohormona y no una vitamina². Desde entonces, la vitamina D ha dejado de considerarse un micronutriente esencial para pasar a estudiarse como una hormona involucrada en un complejo sistema endocrino que regula la homeostasis mineral, protege la integridad del esqueleto y modula el crecimiento y la diferenciación celular en una variedad amplia de tejidos.

Estructura bioquímica

El término *vitamina D* es la denominación genérica de un conjunto de sustancias de estructura química parecida (fig. 1): esteroides derivados del 7-deshidroco-

lesterol (en los animales) o del ergosterol (en los vegetales). Cuando estas sustancias reciben radiación ultravioleta, se transforman, respectivamente, en calciol (la denominada vitamina D₃ o calciferol) y ergocalciferol (denominada vitamina D₂ o ercalciol). El calciol, por tanto, se origina en la piel, pero junto con el ergocalciferol también pueden ingerirse oralmente, y se absorbe en el intestino. Ambas formas de vitamina D sufren un proceso de activación en dos órganos fundamentales: el hígado, donde se produce una 25-hidroxilación, y el riñón, donde tiene lugar una 1 α -hidroxilación, y el calcidiol se transforma en 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (D₃) o calcitriol, que es la forma de mayor actividad biológica.

Desde 1969, la forma circulante más abundante de la vitamina D, el calcidiol, se ha aislado, identificado químicamente y sintetizado. Aunque no es la forma biológicamente más activa, es la que sirve para comprobar la situación verdadera de vitamina D en los pacientes. Se han encontrado alrededor de 33 metabolitos de la vitamina D y productos intermedios de degradación, pero todos ellos menos activos; los más importantes son la 24,25-dihidroxitamina D₃ y la 1 α ,24(R),25-trihidroxitamina D₃.

En el proceso de la 25-hidroxilación actúan 2 enzimas: la 25-hidroxilasa (CYP27), de localización mitocondrial y de procedencia mayoritariamente hepática, y la 25(OH)D₃ 1 α -hidroxilasa (CYP1 α), una enzima microsomal de procedencia renal. Asimismo existe

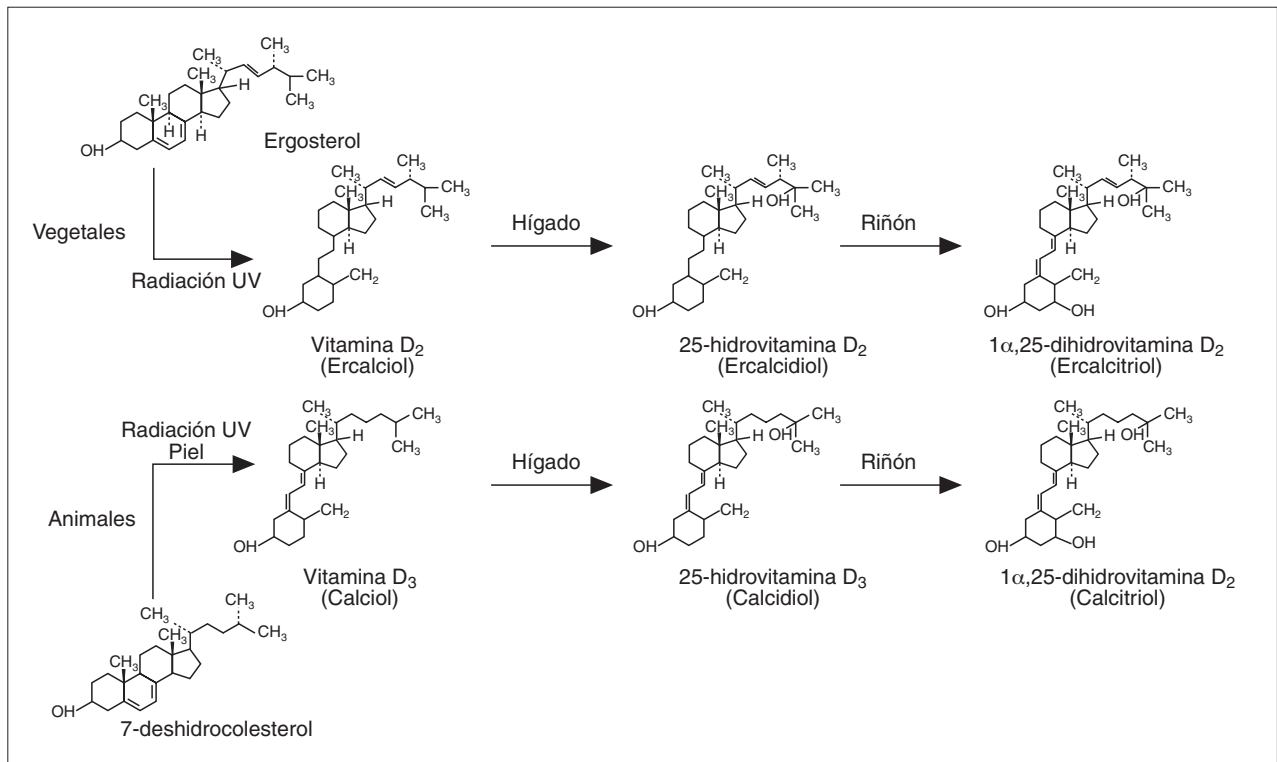


Fig. 1. Formación y estructura química de los diferentes componentes del sistema vitamina D.

una tercera enzima, la 25-hidroxivitamina D-24-hidroxilasa (CYP24) que desempeña funciones catabólicas, como los pasos de degradación del calcitriol, conocidos como la vía de la oxidación C-24, que empieza con la 24-hidroxilación y termina con la forma biliar excretora o ácido calcitroico.

Mecanismo de acción

La vitamina D ejerce sus funciones a través de un receptor, que es un miembro de una superfamilia de receptores nucleares, los llamados de clase II de las hormonas esteroideas, y está muy estrechamente relacionado con los receptores del ácido retinoico, hormonas tiroideas y el activador de la proliferación peroxisómica³. Este receptor se divide en varios dominios: *a*) aminoterminal, de unos 20 aminoácidos y de funciones poco conocidas; *b*) C o de unión al ADN, de unos 70 aminoácidos; *c*) D o región puente, de unos 40 aminoácidos, y *d*) E o carboxiterminal, de unión al ligando, de unos 293 aminoácidos. Este último dominio es muy complejo y es el responsable de funciones muy especializadas, como la unión con alta afinidad al ligando, la unión a factores de transcripción y la dimerización con el receptor del ácido retinoico, que es un coactivador.

De forma esquemática, se pueden describir los sucesivos acontecimientos moleculares que suceden cuando la vitamina D se une a su receptor^{4,5}:

1. Cambio conformacional del receptor, que forma un heterodímero con el receptor del ácido retinoico.

2. Al mencionado dímero se unen otras proteínas y otros coactivadores.

3. La reunión de todos ellos permite la unión del complejo a ciertas zonas del ADN, lo que provoca su acetilación y la liberación de histonas.

4. Determinados factores de transcripción pueden, entonces, iniciar la transcripción de genes diana y la producción de sus correspondientes proteínas.

Se ha demostrado que este complejo mecanismo existe en al menos 30 tejidos diferentes cuya relación sería exhaustiva.

La función principal de la vitamina D es regular la homeostasis del calcio, tanto la sistémica, con acciones en el intestino, los riñones y el hueso, como la intracelular en los diferentes tejidos. La vitamina D mantiene las concentraciones plasmáticas de calcio a través de tres vías:

a. Induce las proteínas que están involucradas en la absorción intestinal del calcio y, además, estimula la absorción intestinal del fosfato; el tipo de proteínas y su inducción es un mecanismo bastante desconocido hasta la fecha.

b. Moviliza el calcio de los huesos, cuando éste está ausente de la dieta, a través de mecanismos complejos, como son la estimulación de los osteoblastos para que éstos produzcan RANKL (receptor del activador nuclear κ), que a su vez activa los osteoclastos para la resorción ósea. En esta movilización cálcica desempeña un papel clave la paratirina (PTH).

c. Tanto la vitamina D como la PTH son responsables de la reabsorción del último 1% del calcio filtrado a través del túbulo renal distal.

La vitamina D puede considerarse una hormona muy importante que no sólo desempeña un papel en la movilización del calcio óseo cuando se requiere, sino en la iniciación del modelado y el remodelado óseo y sus reparaciones correspondientes.

La regulación endocrina del calcio es muy eficaz y sensible. Cuando las concentraciones de calcio descienden, las proteínas transmembranas acopladas a las proteínas G estimulan la secreción de paratirina, que actúa en los osteoblastos y en las células del túbulo contorneado proximal del riñón. Estas células presentan concentraciones elevadas de la enzima 1α -hidroxilasa y sirven de glándula endocrina de la vitamina D, que por sí misma estimula la absorción intestinal de calcio y, junto a la paratirina, la movilización de calcio óseo y la resorción renal de calcio. Como consecuencia de las concentraciones elevadas de calcio se produce una parada en los procesos estimuladores de la glándula paratiroides. Si las concentraciones de calcio se sobrepasan, entonces las células C del tiroides segregan la calcitonina (péptido de 32 aminoácidos), que bloquea la movilización del calcio óseo.

Métodos más usados para su cuantificación

Hay que distinguir entre las dos formas de vitamina D que actualmente tienen utilidad clínica.

Calcidiol o 25-dihidroxivitamina D₃

Sus concentraciones son el índice más fiable para definir las situaciones de déficit, insuficiencia, hipovitaminosis, suficiencia y toxicidad de vitamina D. Los métodos al uso presentan fuertes discrepancias en las concentraciones de calcidiol para las situaciones referidas anteriormente. Durante los años setenta y ochenta, los métodos que predominaban eran los de unión competitiva a las proteínas de transporte, pero conforme se hizo más extensivo el uso clínico del calcidiol, los métodos se simplificaron y en el año 1985 se ideó el primer RIA que eliminaba una previa purificación y no necesitaba de ningún solvente orgánico y evaporación⁶. De todas formas, este método presentaba el inconveniente de usar como trazador tritio (^3H); esto fue obviado cuando en 1993 se introdujo el marcador de yodo (^{125}I)⁷, aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) y comercializado por DiaSorin Corporation (Stillwater, MN, Estados Unidos). Posteriormente, otros fabricantes obtuvieron licencia por la FDA para comercializar equipos para medir el calcidiol.

Según un informe reciente de participantes en un programa de evaluación externa de la calidad (DE-QAS)⁸, un 38% de laboratorios usaba el método de RIA Diasorin, un 27% el método de RIA IDS, un 12% el método de análisis de unión competitiva automatizado Nichols Advantage, un 10% el método de ELISA IDS, un 6% el método de cromatografía líquida de

alta presión, un 3% el método de unión competitiva cromatográfica elaborado en los propios laboratorios y un 4% restante métodos desconocidos. La mayoría de los laboratorios (65%) usaba métodos de RIA por su fácil manejo y fiabilidad. En términos breves, los métodos de RIA consisten en:

1. Un primer paso de extracción del calcidiol y otros metabolitos hidroxilados con acetonitrilo.
2. Incubación de la hormona marcada con el trazador ^{125}I , la muestra del paciente y el anticuerpo anti-calcidiol.
3. Segunda incubación con un complejo precipitante, que generalmente es un anticuerpo contra el primer anticuerpo del paso anterior, junto con polientilenglicol.
4. Centrifugación, lectura de la radioactividad y cálculo de resultados.

Estos métodos tienen la limitación de medir todas las formas 25-hidroxiladas de la vitamina D, mientras que la cromatografía líquida las distingue, aunque en seres humanos estos compuestos se encuentran presentes a concentraciones picomolares.

Calcitriol o 1,25-dihidroxivitamina D_3

Es la hormona biológicamente activa del complejo vitamina D y, por tanto, la que ejerce sus funciones a través de receptores propios en órganos diana, estimulando la absorción intestinal del calcio y el incremento de la reabsorción ósea e inhibiendo la producción de paratirina. Sus concentraciones son picomolares, a diferencia de las del calcidiol, que son nanomolares, por lo que su utilidad clínica como marcador nutricional es más limitada.

En el informe anteriormente mencionado de la calidad DEQAS, un 59% de laboratorios participantes usaban el método de RIA IDS, un 30% el método de RIA Diasorin, un 3% el método de RIA de Biosource, otro 3% un método de RIA con previa separación por cromatografía líquida y un 4% restante por métodos desconocidos. En términos generales, los métodos de RIA, si exceptuamos el de separación previa con cromatografía líquida, consisten en:

1. Inmunoeextracción del calcitriol mediante un anticuerpo monoclonal.
2. Incubación del calcitriol inmunoeextraído con un anticuerpo durante 24 h.
3. Posterior incubación con calcitriol marcado con ^{125}I .
4. Siguiendo incubación con un complejo anticuerpo-anti IgG y celulosa.
5. Centrifugación, lectura de la radioactividad y cálculo de resultados.

Condiciones de extracción sanguínea, conservación de las muestras e interferencias

Para la cuantificación de las dos formas de vitamina D puede usarse tanto plasma como suero en muestras no hemolizadas; el plasma puede obtenerse indistintamente usando como anticoagulantes EDTA o hepari-

na. La sangre se puede recoger en tubos de vidrio estándar de casas comerciales; tras su extracción, la sangre se centrifuga a 1.200 g durante 10 min y temperatura ambiente.

El suero o plasma puede procesarse en el momento o almacenarse a diferentes temperaturas, según el tiempo que se tarde en procesarlo: a) 3 días a 25 o 4 °C; b) 2 semanas a -20 °C, y c) períodos más prolongados de tiempo para serotecas, a -70 °C y previa evaluación. No es aconsejable repetir ciclos de congelación/descongelación, y es obligatorio congelar la muestra y mantenerla congelada en su transporte a otros centros.

Las interferencias analíticas más conocidas se deben a las concentraciones elevadas de bilirrubina, lípidos y hemoglobina.

Uso clínico y correcta interpretación de las concentraciones de calcidiol y calcitriol

En otro apartado de este artículo se indicaba que aunque el calcitriol es la hormona biológicamente activa de la vitamina D y el metabolito más eficaz, las concentraciones de calcidiol son el mejor indicador para verificar la insuficiencia, suficiencia o toxicidad de vitamina D en un individuo. Aún no hay un consenso para definir los valores de corte en las diferentes situaciones de déficit de calcidiol, suficiencia y toxicidad.

1. Concentraciones < 12,5 nmol/l serían claramente patognómicas de raquitismo en niños y osteomalacia en adultos, y considerados como grave deficiencia en vitamina D⁹.

2. Concentraciones < 25 nmol/l podrían conducir a la larga a estas 2 situaciones y se pueden considerar como de moderada deficiencia¹⁰.

3. Concentraciones < 40-50 nmol/l reflejarían insuficiencia leve de vitamina D y podrían abocar a alteraciones funcionales, como hiperparatiroidismo¹¹.

4. Concentraciones entre 50 y 100 nmol/l pueden considerarse como hipovitaminosis D y sus reservas orgánicas disminuidas con la consiguiente elevación de paratirina, aun en el rango de normalidad¹².

5. Concentraciones entre 100 y 200 nmol/l se podrían considerar propias de una suficiencia de vitamina D¹³. Estos 2 últimos apartados están en discusión entre diferentes autores, y existiría un consenso de que concentraciones > 50 nmol/l son las correspondientes a una situación de normalidad y variarían en función de la ingesta cálcica². Conversiones:

$$25\text{-hidroxivitamina D pg/ml} \times 2.400 = \text{pmol/L}$$

$$1\text{-25 hidroxivitamina D ng/ml} \times 2.496 = \text{nmol/L}$$

La medición de las concentraciones del calcidiol está teniendo cada vez más relevancia en diferentes trastornos del metabolismo del calcio, como raquitismo, hipocalcemia neonatal, embarazo, osteodistrofia renal y nutricional, hipoparatiroidismo y osteoporosis posmenopáusica.

Independientemente de la relación entre la vitamina D y el hueso, existen asociaciones de esta hormona con determinadas enfermedades crónicas¹⁴:

1. *Miopatía*. Los pacientes con osteomalacia padecen de debilidad muscular y tienen disminuidas las concentraciones de enzimas musculares; el origen de la insuficiencia cardíaca congestiva por estar alterada la contractilidad del miocardio pueden ser las concentraciones bajas de vitamina D.

2. *Infecciones*. En países subdesarrollados o en desarrollo existe mayor prevalencia de infecciones en niños con raquitismo nutricional, y pacientes con tuberculosis presentan valores de vitamina D disminuidos. Esta relación puede estar basada en que el calcitriol potencia la actividad de las enzimas lisosómicas en los macrófagos, y además estas células, que representan la primera línea de defensa inespecífica del sistema inmune, contienen la enzima 1α -hidroxilasa que convierte calcidiol a calcitriol.

3. *Enfermedades autoinmunes e inflamación*. Las concentraciones bajas de vitamina D pueden ser causa de la artritis reumatoide, la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y la esclerosis múltiple, ya que suplementos nutricionales y farmacológicos de calcio y calcitriol pueden mejorar estas enfermedades y detener su progresión.

4. *Hipertensión esencial*. Se ha observado una disminución de las presiones sistólica y diastólica después de una exposición a los rayos ultravioleta B, y una relación inversa entre concentraciones de calcitriol y presión diastólica.

5. *Enfermedad cardiovascular*. Se ha encontrado una relación inversa entre infarto de miocardio y concentraciones de calcitriol, y la actividad física se asocia a valores elevados de calcidiol y calcitriol.

6. *Diabetes*. Se conoce la dependencia existente entre la secreción de insulina y vitamina D, una disminución en la actividad de la vitamina D puede provocar una insulinoresistencia y una secreción disminuida de insulina.

7. *Cáncer*. Existe una asociación entre una mayor exposición a los rayos solares y mayor ingesta de alimentos ricos en vitamina D y una menor incidencia de cáncer de próstata, mama y colon.

Estudios demográficos

Las concentraciones de calcidiol y calcitriol tienen una marcada variabilidad estacional, con valores menores en invierno respecto al verano y en latitudes de 52°N respecto a 32°N . Esta variabilidad estacional es menos acusada y más difícil de establecer en personas mayores, dado que su piel tiene menor capacidad de producir vitamina D y, además, realizan generalmente menos actividades al aire libre.

Se han observado diferencias raciales en las concentraciones de calcidiol; en la población de raza negra, estas concentraciones son más bajas y su variabilidad estacional es más atenuada que en la población de raza blanca, aunque en ambas razas existe una capacidad similar de absorción y síntesis de vitamina D. La eficacia en la población de raza negra puede ser inferior debido a la marcada pigmentación de la piel¹⁵.

En la población blanca, unas concentraciones de calcidiol alrededor de 80 nmol/l pueden ser las adecuadas para mantener una buena salud ósea y esto se consigue con una ingesta de 800-1.000 U/día de vitamina D_3 ¹⁶.

Se tiene que llamar la atención sobre la interpretación de los valores de calcidiol y calcitriol, y el uso de la suplementación de vitamina D; dado que existe una marcada variabilidad entre laboratorios en las concentraciones de vitamina D, el punto de corte de las concentraciones óptimas de calcidiol (70-80 nmol/l) y la detección de hipovitaminosis son muy discordantes según los laboratorios¹⁷. Los métodos más frecuentemente usados, los de RIA, utilizan diferentes anticuerpos que detectan diferentes formas moleculares de calcidiol; unos reconocen 25-OH- D_2 (25-hidroxi ergocalciferol) y 25OHD₃ y otros infravaloran la propia 25-OH- D_2 . Por tanto, es necesario establecer una correcta definición del umbral exacto de la situación de vitamina D en una comunidad a través de un método bien estandarizado y con valores de referencia propios, para de esta forma indicar una adecuada suplementación¹⁸.

PARATIRINA (PTH)

La paratirina, una hormona segregada por las glándulas paratiroides como respuesta a pequeños cambios en las concentraciones de calcio, actúa directamente sobre el hueso y los riñones, y tiene efectos catabólicos y anabólicos sobre el esqueleto, dependiendo de que su acción sea continua o intermitente. Es el regulador más importante en la homeostasis del calcio, ya que cualquier descenso en la concentración de éste provoca un incremento en la concentración de paratirina, y a la inversa, ejerciendo un mecanismo negativo de retroalimentación potenciando su reabsorción tubular renal e incrementando sus concentraciones en sangre; asimismo, incrementa la resorción ósea osteoblástica¹⁹. En la propia glándula paratiroidea, la PTH sufre un proceso de proteólisis, y posteriormente su metabolización continúa en el hígado, el riñón y los huesos.

Estructura molecular

La paratirina es un péptido de 84 aminoácidos sintetizado como parte de una molécula precursora más grande, la preparatirina, de 31 aminoácidos adicionales (fig. 2a). Esta molécula sufre un proceso de rotura en el retículo endoplásmico, y se segrega a la circulación como molécula madura pero inmunológicamente distinta de la paratirina glandular. En la circulación existen diferentes formas cuya procedencia tisular, vida media, destino y afección en la enfermedad son distintas, y el conocimiento de esta heterogeneidad ha sido muy importante para interpretar datos procedentes de métodos específicos según región. De estas diferentes formas, existen 2 mayoritarias: a) intacta (1-84), que es biológicamente activa, y

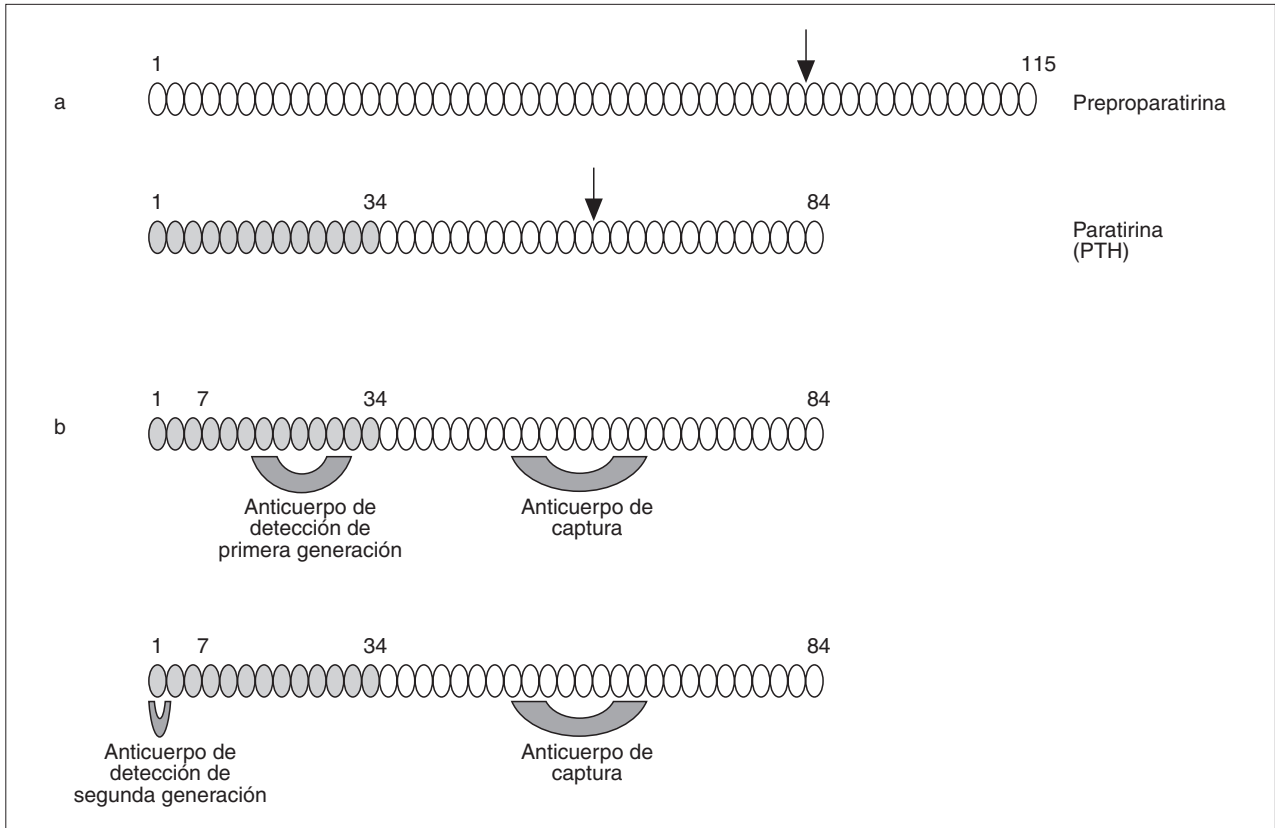


Fig. 2. a) Formación de la paratirina a partir de su molécula precursora (preproparatirina); sombreada, se muestra la región biológicamente activa; b) descripción de las zonas de reconocimiento antigénico de los anticuerpos de detección utilizados en los métodos de primera y segunda generación para cuantificar la paratirina.

b) fragmentos relacionados, que constituyen las porciones media y carboxiloterminales (39-84), hPTH (39-68), hPTH (44-68) y hPTH (53-84), todos ellos biológicamente inactivos al no contener los aminoácidos 1-34.

Mecanismo de acción

La unión de la paratirina a su receptor se realiza a través de la región aminoterminal o N-terminal; dentro de los 34 aminoácidos de esta región está la clave en las interacciones de alta afinidad que esta hormona presenta con su receptor, alguna de las cuales son cruciales para su activación y cambio conformacional. Se han identificado y clonado 3 receptores, PTHR1²⁰, PTHR2²¹ y PTHR3²²; el primero es el más conocido; el PTHR2 se expresa en el sistema nervioso central, el páncreas, el testículo y la placenta, y su ligando natural parece ser que no es la propia paratirina, sino un péptido tuberoinfundibular de 39 aminoácidos (TIP39), que a su vez podría ser un inhibidor de la paratirina al unirse al PTHR1. Adicionalmente, y relacionado con los aspectos de la secreción heterogénea de paratirina, cobra más fuerza la existencia de un receptor específico de las regiones media y C-terminal de esta hormona, llamado C-PTHr²³. Así, el PTHR1 mediaría la mayo-

ría de las acciones biológicas clásicas de la molécula intacta de la paratirina en los correspondientes tejidos diana, mientras el C-PTHr, al unirse a fragmentos de las regiones media y C-terminal, tendría relevancia en algunos aspectos de la modulación de la actividad celular ósea. Una vez que la paratirina ha interactuado con sus receptores se inicia el proceso de transducción de señal intracelular a través de las proteincinasas A y C; los segundos mensajeros de esa señal son fundamentalmente el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y en menor participación Ca⁺⁺ e IP₃.

Hay que indicar que la PTH-rP, proteína relacionada con la paratirina, con sus tres isoformas de 139, 141 y 171 aminoácidos, cuya relevancia fundamental reside en el diagnóstico del síndrome de hipercalcemia humoral maligna, se une también, con igual afinidad que la paratirina, al PTHR1, y a través del mismo efectúa el proceso de transducción de señal y estímulo de segundos mensajeros indicado anteriormente.

¿Cómo efectúa la paratirina sus acciones sobre los órganos diana?:

1. Regulación de la formación ósea. Este efecto anabólico²⁴ lo ejerce a través de 3 vías: a) estimulando la proliferación de preosteoblastos; b) promoviendo la diferenciación de preosteoblastos y osteoblastos, y c) inhibiendo la apoptosis osteoblástica.

2. *Regulación de la resorción ósea.* Favorece la diferenciación, el aumento y la activación de los osteoclastos indirectamente, a través de los osteoblastos, mediante un mecanismo sutil de equilibrio entre el ligando del receptor RANK (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG), aumentando la concentración del primero y disminuyendo la concentración de la segunda, con el consiguiente aumento de la razón RANKL/OPG²⁵.

3. *Acoplamiento entre la formación y la resorción ósea.* El remodelado óseo normal permite que estos dos pasos se realicen de forma escalonada y acoplada, de tal forma que la activación y formación de osteoclastos precede a la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos²⁶.

En la figura 3 se describe la interrelación entre vitamina D, PTH y sus órganos diana.

Métodos más usados para la medición de la concentración de paratirina

Los métodos para cuantificar paratirina han evolucionado desde que Berson et al²⁷ describieron el primer método inmunoquímico en el año 1963. Entonces se usaba paratirina intacta o fragmentos sintéticos marcados con isótopos radioactivos, y por medio de un método de desplazamiento competitivo se medían las concentraciones de la misma en suero o plasma. Dado que la mayoría de los fragmentos antigénicos de la paratirina se localizan en las regiones media o carboxiloterminales de la molécula, todos los RIA de la época y las décadas posteriores detectaban una variedad de fragmentos carboxilo, aparte de la molécula completa, por lo que añadía problemas de interpretación clínica de los resultados, sobre todo en pacientes con insuficiencia renal crónica²⁸.

A final de los años ochenta se introdujeron los métodos inmunométricos o sándwich, llamados así porque emplean un antígeno emparejado entre 2 anticuerpos para detectar péptidos de larga cadena y minimizan la reacción cruzada con fragmentos más pequeños; las etapas de un método sándwich de primera generación se pueden resumir del modo siguiente:

1. Un anticuerpo dirigido contra un epitopo antigénico de la región C-terminal de la paratirina unido a una fase sólida o anticuerpo de captura.

2. Otro segundo anticuerpo dirigido contra a otro epitopo antigénico de la región N-terminal, marcado con isótopos radioactivos o sustancias quimioluminiscentes, llamado anticuerpo de detección.

3. Alícuotas de plasma o suero de concentraciones desconocidas de paratirina se incuban con ambos.

4. La cantidad de señal producida por la unión antígeno-anticuerpo de detección es directamente proporcional a la concentración de sustancia. Dado que los 2 anticuerpos son diseñados frente a dos regiones distantes entre sí de la molécula de paratirina, solamente se detectarán los péptidos de tamaño suficiente para abarcar esta distancia.

A pesar de este diseño metodológico, en estos sándwichs de primera generación, puede existir reacción cruzada con péptidos de larga cadena procedentes de la región aminoterminal rota de la paratirina, y que se metabolizan en algunos estadios de la insuficiencia renal²⁹. Para subsanar este problema, se idearon los métodos inmunométricos de segunda generación. La diferencia fundamental entre las dos generaciones de métodos radica exclusivamente en el anticuerpo de detección (fig. 2b); en los de primera generación, éste se dirige contra los residuos aminotermiales 15-34 de la cadena, mientras que en los de segunda generación se dirige contra los primeros residuos de la cadena, por

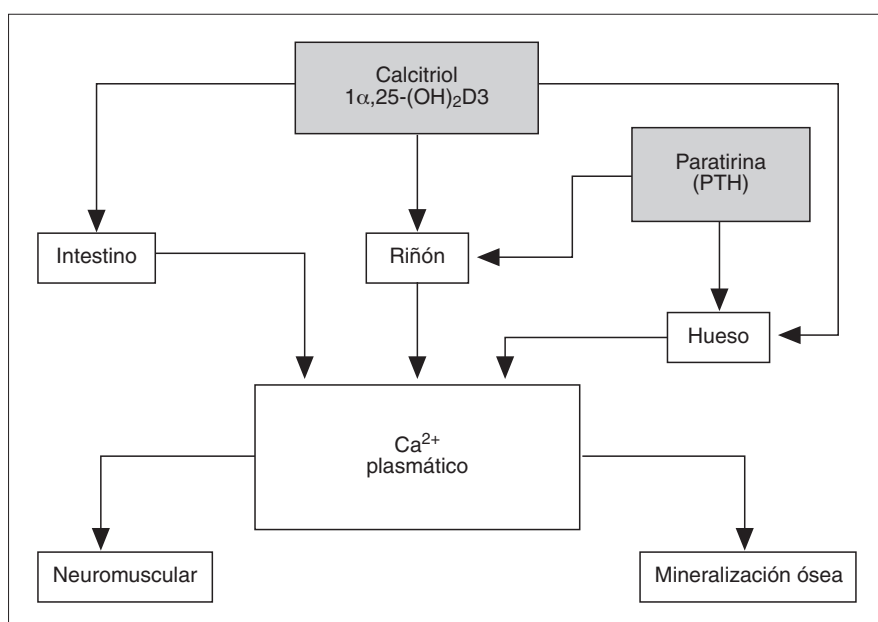


Fig. 3. Esquema global de la interrelación de vitamina D, paratirina y sus órganos diana.

lo que los péptidos que se producen en la insuficiencia renal no se detectan³⁰.

Aún se han hecho modificaciones a estos métodos de segunda generación, consistentes en dirigir el anticuerpo de detección solamente contra el primer aminoácido de la región aminoterminal de la paratirina; estos métodos sí que eliminan cualquier reacción cruzada con péptidos rotos desde el aminoácido 1³¹. Obviamente, las concentraciones de paratirina medidas en ambos métodos son diferentes y pueden llegar a ser entre un 40-50% más bajas para los de segunda generación con respecto a los de la primera.

Actualmente, está muy extendido un método automatizado secuencial inmunométrico y quimioluminiscente en fase sólida (Immulate 2000), que usa un anticuerpo de captura monoclonal frente a los aminoácidos 44-84 unido a unas bolitas, y un anticuerpo de detección policlonal frente a los aminoácidos 1-34 marcado con fosfatasa alcalina, y potenciada la señal final con un sustrato quimioluminiscente; este método presenta una reacción cruzada no detectable frente los fragmentos 1-34, 1-44, 44-68 y 53-84 de la paratirina³².

Condiciones de extracción, conservación de muestras e interferencias

La toma de muestras debe realizarse con el paciente en ayunas después de las 7.00 h de la mañana, dado el marcado ritmo circadiano de la paratirina, que presenta valores más elevados durante la noche (hay algunos autores que aconsejan efectuar la extracción después de las 10 de la mañana para discriminar entre población normal e hiperparatiroidismo primario leve). Habitualmente la muestra es suero obtenido de sangre coagulada y centrifugada a 1.200 g durante 10 min a 25 o 4 °C, indistintamente.

Las muestras de plasma con EDTA también pueden usarse, aunque debe existir una proporción adecuada entre volumen de sangre y EDTA, ya que el exceso de este anticoagulante puede causar resultados de concentración falsamente baja.

Los tubos pueden ser vidrio o plástico con gel inerte.

Las interferencias, aparte de la mencionada por exceso de concentración de EDTA, se deben a concentraciones elevadas de hemoglobina, bilirrubina y lípidos; asimismo, la fibrina puede causar interferencia, por lo que antes de centrifugar las muestras debe esperarse a la obtención de un buen coágulo.

Si las muestras no se pueden procesar y analizar en el momento, se recomienda almacenarlas entre 2 y 8 °C durante 8 y 10 h; en caso de almacenamiento más prolongado, la estabilidad se puede mantener durante 6 meses a -20 °C.

Utilidad clínica

Hiperparatiroidismo primario

Es la tercera enfermedad endocrina tras la diabetes y la enfermedad tiroidea, y es causada por una secre-

ción autónoma de paratirina, bien por adenoma solitario, hipertrofia pluriglandular o enfermedad maligna; en su forma sintomática, el diagnóstico se efectúa por la hipercalcemia asociada a elevadas concentraciones de paratirina. Con los actuales métodos para cuantificar esta última, se distingue claramente a los pacientes hipercalcémicos por hiperparatiroidismo primario de los que presentan hipercalcemia de otro origen. Aunque la concentración de paratirina va aumentando con la edad, el diagnóstico en edades avanzadas es válido y claro con esta hormona^{33,34}. Aun en los casos de mujeres con normocalcemia y paratirina elevada, descartando causas secundarias de la elevación, ésta podría llegar a ser diagnóstica de las primeras fases de hiperparatiroidismo primario.

En pacientes de edad y con indicación quirúrgica del hiperparatiroidismo primario, su seguimiento debe hacerse midiendo calcio y paratirina a las 2 semanas, los 6 meses y los 12 meses de la intervención.

Tumores ováricos, carcinomas de pulmón de células pequeñas y timomas

Causas extraordinariamente raras que provocan secreción de paratirina³⁵.

Hiperparatiroidismo secundario

Se produce principalmente, cuando las glándulas paratiroides se estimulan constantemente por fallo renal crónico, y las concentraciones disminuidas de calcitriol en esta situación provocan una hiperplasia glandular, debida a la interrupción del mecanismo de alimentación negativo sobre la paratiroides; otra causa puede ser la hiperfosfatemia de esta insuficiencia renal crónica. Como consecuencia de esta hipertrofia glandular, se producen concentraciones elevadas de paratirina aún cuando las concentraciones de calcio sean normales o bajas³⁶.

Hiperparatiroidismo terciario

Como consecuencia de una prolongada persistencia del hiperparatiroidismo secundario, se puede provocar una elevada secreción autónoma de paratirina³⁷.

Hipercalcemia tumoral maligna

Casos con concentraciones elevadas de calcio y disminuidas o normales de paratirina. En esta situación existe una inapropiada secreción de la proteína relacionada con la paratirina (PTHrP), procedente de las células tumorales³⁸.

Hipercalcemia hipocalciúrica benigna familiar

El síndrome es secundario a una mutación en los receptores sensibles al calcio. Como su nombre indica, existen concentraciones aumentadas de calcio plasmático y disminuidas de calcio urinario; en estos casos, la PTH se mantiene en valores normales (muy probablemente es característico de este síndrome que no se excedan los 3 pmol/l)³⁹.

Formas hereditarias de hipoparatiroidismo: hipocalcemia hipercalcúrica autosómica dominante

Un calcio plasmático no inferior a 1,20 mmol/l, una magnesemia < 0,70 mmol/l, una razón calcio urinario/creatinina > 0,30 y una paratirina entre 1 y 3,3 pmol/l podrían ser los rasgos diagnósticos bioquímicos, aunque para distinguirlo del hipoparatiroidismo idiopático habría que efectuar un estudio genético⁴⁰.

La paratirina como magnitud en la cabecera del enfermo (rápida intraoperatoria)

Burkitt⁴¹ definió los criterios que tendría que reunir cualquier prueba intraoperatoria: "Segura, reproducible, sencilla de interpretar y rápida. Además, no debería tener un coste económico excesivo". Entre el conjunto de las pruebas de laboratorio realizadas en la cabecera del enfermo, una de las más precisas y exactas es la paratirina intraoperatoria. Desde su implantación, ha tenido diferentes modificaciones y actualmente se ha instaurado en el protocolo quirúrgico del hiperparatiroidismo.

Aunque el tratamiento quirúrgico del hiperparatiroidismo tenía un éxito bastante elevado (90-95%), en algunos pacientes persistía la hipercalcemia tras la cirugía, y adicionalmente se tenía que efectuar una disección completa del cuello e inspeccionar las cuatro glándulas, con el consiguiente aumento de morbilidad. En 1988, después de la llegada de los métodos sándwich para paratirina, se propuso una versión modificada del método, reduciendo los tiempos de incubación a 15 minutos. Si se tiene en cuenta esta modificación metodológica, y que la vida media de la paratirina intacta es < 5 min y que su concentración sanguínea disminuye rápidamente en un corto período de tiempo tras la extirpación del tejido paratiroideo hipersecretor, la medición de la concentración de paratirina se introdujo como prueba protocolizada en campo operatorio abierto⁴².

El protocolo inicial y básico consiste en: a) extracción sanguínea de venas periféricas en condiciones basales; b) extracción sanguínea a los 10 min de escisión tumoral, y c) cuantificación de paratirina de las 2 muestras. Se valora como éxito quirúrgico la disminución de la concentración de la hormona en un 50% o más en la segunda muestra respecto a la primera.

El protocolo anteriormente expuesto presenta variantes según el centro hospitalario y la metodología usada:

1. Algunos han propuesto descensos del 40, el 60 y el 75% para valorar éxito quirúrgico.

2. Extracción de sangre directamente de venas del cuello.

3. Para agilizar más el proceso, otros cuantifican la paratirina en sangre total.

4. Debido a que durante la apertura del campo quirúrgico existen manipulaciones de tejido, se puede estimular la secreción de paratirina, por lo que en algunos centros se efectúa la toma de tres muestras, una basal, otra abierto el campo quirúrgico, que se considera preexéresis y otra tras la exéresis; se realiza fun-

damentalmente para evitar falsos negativos en pacientes con un solo adenoma.

5. Otros usan sólo una muestra tras escisión inmediata, y valoran si las concentraciones de paratirina descienden dentro del intervalo de referencia.

6. Otros predicen el éxito quirúrgico estableciendo un algoritmo que combina la variabilidad interindividual en la vida media y el descenso de un 50%, con lo que se estudia el *decay* de la hormona.

Existen, actualmente, varios sistemas automáticos o semiautomáticos que realizan este tipo de prueba y según el informe del College of American Pathologists Point-of-Care Testing⁴³, el 47% de laboratorios que realizaban esta prueba lo hacían con el sistema Turbo Immulite de DPC, el 33% con el Quick-Intraoperative de Nichols y el 7% con el Elecsys de Roche.

En el ámbito del hiperparatiroidismo primario, este procedimiento ha demostrado tasas de curación de hasta > 95% y hasta 5 años de seguimiento. Asimismo, es muy útil en los hiperparatiroidismos secundario y terciario, en casos de reintervención por fracaso quirúrgico o enfermedad recurrente. También puede permitir predecir hipocalcemia grave posquirúrgica en pacientes reintervenidos con enfermedad multiglandular. Últimamente se está usando para monitorizar la función paratiroidea durante la tiroidectomía e identificar pacientes de riesgo con hipocalcemia^{44,45}.

Adicionalmente, en combinación con métodos de localización y en adenomas solitarios, se puede realizar una pequeña incisión mínimamente invasiva y una paratiroidectomía endoscópica, lo que supone solamente anestesia locoregional, satisfacción cosmética para el paciente y realización ambulatoria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Steenbock H, Black A. The reduction of growth-promoting and calcifying properties in a ration by exposure to ultra-violet light. *J Biol Chem.* 1924;61:408-22.
2. DeLuca H. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004;80 Suppl:S1689-96.
3. Walters M, Nemere I. Receptors for steroid hormones: membrane-associated and nuclear forms. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61:2309-21.
4. Jones G, Strugnell SA, DeLuca F. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev.* 1998;78:1193-231.
5. Sutton A, MacDonald PN. Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol.* 2003;17:777-91.
6. Hollis B, Napoli JL. Improved radioimmunoassay for vitamin D and its use in assessing vitamin D status. *Clin Chem.* 1985; 31:1815-9.
7. Hollis B, Kamerud JQ, Selvaag SR, Lorenz JD, Napoli JL. Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an 125I-labeled tracer. *Clin Chem.* 1993;39:529-33.
8. Carter G, Carter CR, Gunter E, Jones J, Jones G, Makin HLJ, et al. Measurement of vitamin D metabolites: an international perspective on methodology and clinical interpretation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89-90:467-71.
9. Scharla S. Prevalence of subclinical vitamin D deficiency in different european countries. *Osteoporosis Int.* 1998;8:S7-12.
10. Basha B, Rao DS, Han ZH, Parfitt AM. Osteomalacia due to vitamin D depletion: a neglected consequence of intestinal malabsorption. *Am J Med.* 2000;108:296-300.

11. Vieth R, Cole DE, Hawker GA, Trang HM, Rubin LA. Wintertime vitamin D insufficiency is common in young Canadian women, and their vitamin D intake does not prevent it. *Eur J Clin Nutr.* 2001;55:1091-7.
12. Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet.* 1998;351:805-6.
13. Lamberg-Allardt C, Outila TA, Kärkäinen MUM, Rita HJ, Valsta LM. Vitamin D deficiency and bone health in healthy adults in Finland: could this be a concern in other parts of Europe? *J Bone Miner Res.* 2001;16:2066-73.
14. Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr.* 2003;89:552-72.
15. Dawson-Hughes B. Racial/ethnic considerations in making recommendations for vitamin D for adult and elderly men and women. *Am J Clin Nutr.* 2004;80 Suppl:S1763-6.
16. Kyriakidou-Himonas M, Aloia JF, Yeh JK. Vitamin D supplementation in postmenopausal black women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3988-90.
17. Lips P, Chapuy MC, Dawson-Hughes B, Pols HAP, Holick MF. An international comparison of serum 25-hydroxyvitamin D measurements. *Osteoporosis Int.* 1999;9:394-7.
18. Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, Plum L, Lake E, Hansen KE, et al. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3152-7.
19. Qin L, Raggatt LJ, Partridge NC. Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15:60-5.
20. Abou-Samra A, Jüppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, et al. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:2732-6.
21. Usdin T, Gruber C, Bonner TI. Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem.* 1995;270:15455-8.
22. Rubin D, Jüppner H. Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by a mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide. *J Biol Chem.* 1999;274:28185-90.
23. Divieti P, John MR, Jüppner H, Bringhurst FR. Human PTH-(7-84) inhibits bone resorption in vitro via actions independent of the type 1 PTH/PTHrP receptor. *Endocrinology.* 2002;143: 171-6.
24. Qin L. Gene expression profiles and transcription factors involved in parathyroid hormone signaling in osteoblasts revealed by microarray and bioinformatics. *J Biol Chem.* 2003;278:19723-31.
25. Locklin R. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem.* 2003;80:180-90.
26. Finkelstein J. The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2003;349:1216-26.
27. Berson S, Yalow RS, Aurbach G, Potts JT Jr. Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1963;49:613-7.
28. Mallette L, Coscia AM. Rapid radioimmunoassay for parathyroid hormone: its use in hypercalcemic crisis. *South Med J.* 1984;77:323-6.
29. Lepage R, Roy L, Brossard JH, Rousseau L, Dorais C, Lazure C, et al. A non-(1-84) circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples. *Clin Chem.* 1998;44:805-9.
30. John M, Goodman WG, Gao P, Cantor TL, Salusky IB, Jüppner H, et al. A novel immunoradiometric 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.
31. Gao P, Scheibel S, D'Amour P, John MR, Rao SD, Schmidt-Gayk H, 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.
32. Goodman W, Jüppner H, Salusky IB, Sherrard J. Parathyroid hormone (PTH), PTH-derived peptides, and new PTH assays in renal osteodystrophy. *Kidney Int.* 2003;63:1-11.
33. Younes N, Shafagoj Y, Khatib F, Ababneh M. Laboratory screening for hyperparathyroidism. *Clin Chim Acta.* 2005;353:1-12.
34. Boonen S, Vanderschueren D, Pelemans W, Buillon R. Primary hyperparathyroidism: diagnosis and management in the older individual. *Eur J Endocrinol.* 2004;151:297-304.
35. Strewler G, Nissenson RA. Hypercalcemia in malignancy. *West J Med.* 1990;153:635-40.
36. Silver J, Kilav R, Naveh-Manly T. Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;283: 367-76.
37. Demeure M, McGee DC, Wilkes W, Duh QY, Clark OH. Results of surgical treatment for hyperparathyroidism associated with renal disease. *Am J Surg.* 1990;160:337-40.
38. Syed M, Horwitz MJ, Tedesco MB, García Ocaña A, Wisweski SR, Steewart AF. Parathyroid hormone-related protein-(1-36) stimulates renal tubular calcium reabsorption in normal human volunteers: implications for the pathogenesis of humoral hypercalcemia of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1525-31.
39. Gunn R, Gaffney D. Clinical and laboratory features of calcium-sensing receptor disorders: a systematic review. *Ann Clin Biochem.* 2004;41:441-58.
40. Ariyan C, Sosa JA. Assessment and management of patients with abnormal calcium. *Crit Care Med.* 2004;32:S146-54.
41. Burkitt D. Intraoperative testing for completeness of vagotomy. *Surg Annu.* 1989;21:135-55.
42. Nussbaum S, Thomsson AR, Hutcheson BA, Gaz RD, Wang C. Intraoperative measurement of parathyroid hormone in the surgical management of hyperparathyroidism. *Surgery.* 1988;104:1121-7.
43. Hortin G, Carter AB. Intraoperative parathyroid hormone testing: survey of testing program characteristics. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126:1045-9.
44. Carter A, Howanitz PJ. Intraoperative testing for parathyroid hormone. A comprehensive review of the use of the assay and the relevant literature. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127:1424-42.
45. Lam A, Kerr PD. Parathyroid hormone: an early predictor of postthyroidectomy hypocalcemia. *The Laryngoscope.* 2003; 113: 2196-200.