Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol 40 • No. 1
Copyright © 2003 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo

TRABAJO ORIGINAL

El Estradiol y la Estrona modulan la función vascular por mecanismos diferentes.

"Rat aorta rapid response to Estrone and Estradiol are mediated by different mechanisms"

Massheimer, V.; Polini, N.; Benozzi, S.; Alvarez, C.; Sellés, J.

Cátedra de Análisis Clínicos II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. B8000ICN. Bahía Blanca.

Resumen

Previamente demostramos que el estradiol y la progesterona inhiben la agregación plaqueteria (AP) en forma dependiente de óxido nítrico (NO), y la progesterona regula la actividad de la ciclooxigenasa endotelial. En este trabajo estudiamos el mecanismo de acción no genómico de estrona (E_1) en anillos de aorta de ratas fértiles y se lo comparó con el demostrado para estradiol (E_2). Se trataron "in vitro" anillos de aorta de ratas hembra con E_1 o estradiol (E_2) determinando la inhibición de la agregación plaquetaria; actividad óxido nítrico sintasa (NOS); y eicosanoides liberados al medio. El incremento de NO inducido por las hormonas es abolido por metil ester de N-nitro-L-arginina (L-NAME). A diferencia del E_2, la presencia del ácido etilenglicol-bis amino tetracético (EGTA) no modifica el estímulo sobre la NOS inducido por E_1. La E_1 induce una menor inhibición de la AP que E_2. Ambos estrógenos aumentan la producción de prostaciclina (PGI_2), siendo el estímulo de E_1 significativamente menor. La síntesis de Tromboxano (Tx) es solamente activada por E_1. En presencia de Indometacina el efecto antiagregante de E_1 es equivalente al del estradiol. Estos resultados sugieren que a nivel vascular estradiol y estrona actúan por mecanismos distintos.

Abstract

Introduction: Postmenopausal women have an increased risk for cardiovascular disease which is associated to the lost of the vascular protective action of estradiol. In this period circulating estradiol (E_2) levels are considerably low, but estrone (E_1) remain high due to its periferic synthesis. The endothelium produces different active metabolites such as Nitric Oxide (NO) and eicosanoids (thromboxane, prostaglandins and prostacycline) which regulate arterial vasomotor properties and platelet aggregation. Previously we demonstrated that rat aortic tissue treated with physiological concentrations of estradiol and progesterone for 1-5 min inhibits platelet aggregation mediated by NOS activation. We also reported progesterone rapid action of aortic ciclooxigenase.

Dirección postal: Dra. Juana Sellés. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. UNS
San Juan 670, B8000ICN Bahía Blanca. E-mail: jselles@uns.edu.ar
Palabras clave: Estradiol, Estrona, Tejido aórtico, Oxido Nítrico, Eicosnoides.
Key wor ds: Estrogen, estrone, aortic tissue, nitric oxide, eicosanoids.

Objectives: The aim of the present study was to compare the mechanism involved in the rat aortic rapid response to E_1 or E_2.
Methods: Rat aortic strips (RAS) with intact endothelium, were treated "in vitro" for 1-5 min with physiologic concentrations of 17β-estradiol or estrone. Platelet aggregation (PA) induced by 10μM ADP was measured in a platelet rich plasma (PRP) which was incubated with RAS and treated with the hormones. NO production was measured by conversion of ^{3}H-arginine to ^{3}H-citruline reaction. ^{3}H-citruline was determined by ion exchange chromatography using a Dowex AG-50WX8 column. Eicosanoids production was measured by thin layer chromatography using ^{3}H-arachidonic acid as precursor.
Results: Increment in NO production induced by 1 nM E_1 treatment was abolished by the presence of L-NAME in the incubation media, confirming that NOS activation in the aortic tissue responses to E_1 as has been demonstrated for E_2. Calcium requirement for aorta NOS rapid activation by E_1 and E_2 treatment was studied. The presence of 0.5 mM EGTA in the incubation mediun abolished the increment of NO production induced by 1 nM 17β-estradiol (2.02±0,26 without vs. 0.9± 0,11pmol NO/mg prot with EGTA), meanwhile tissue response to 1 nM Estrone was not affected by the calium chelator (2.08±0,20 without vs. 2.15±0,22 pmol NO/mg prot. with EGTA), implying that aorta response to E_1 treatment does not require extracellular Ca^{2+}. Both E_2 and E_1 treatment inhibited PA, but the effect elicited by estrone is less potent compared with E_2. The eicosanoid signal transduction pathway is involved in RAS rapid response to 17β-estradiol or estrone. Our results show that both hormones increase PGI_2 release by aortic tissue, with higher stimulus induced by E_1 (86 vs 32 % E_1 and E_2 respectively). On the other hand, thromboxane (Tx) production was only stimulated by E_1. Considering the potent effect of Tx on platelet aggregation, we determined the effect of E_1 treatment on platelet aggregation in the presence of the cyclooxigenase (COX) inhibitor indomethacine. We found that under this experimental condition E_1 treatment produced an inhibition of platelet aggregation equivalent to that elicited by E_2.
Conclusion: These results suggest that E_1 and E_2 modulate rat aortic NOS and COX activity by different mechanisms.

Introducción

El endotelio vascular es un tejido con una importante actividad metabólica que participa activamente en la regulación del tono vascular y en el mantenimiento de las propiedades antiaterogénicas y antitrombóticas. Estas funciones las cumple mediante la producción de factores vasodilatadores como el óxido nítrico (NO) y las prostaciclinas (PGI_2) [1]. El NO es sintetizado por la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe) enzima localizada en la caveola [2]. Su activación es dependiente de Ca^{++} y Calmodulina (CAM), produce pequeñas cantidades de NO, que difunde a la luz arterial induciendo inhibición de la agregación plaquetaria, o trasloca a la capa muscular induciendo vasorelajación dependiente de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). El NO es también producido por la NOS inducible que se expresa en células musculares lisas vasculares (CMLV) bajo estímulo de citoquinas, y que genera grandes cantidades del radical libre en respuesta a reacciones inflamatorias [3]. Las prostaglandinas (PG) y tromboxanos (Tx) se sintetizan a partir del ácido araquidónico por la acción catalítica de la ciclooxigenasa constitutiva (COX-1) o inducible (COX-2). Los eicosanoides PGD_2, PGE_2 y PGI_2 son potentes vasodilatadores y tienen además acción antitrombótica, mientras que el TxA_2 es un potente vasoconstrictor y estimulante de la agregación plaquetaria [4]. Se ha demostrado que la integridad funcional del endotelio se altera en diferentes patologías (hipertensión, hipercolesterolemia) y en ciertas condiciones fisiológicas como la menopausia. La menopausia, es un período en el cual la probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares se incrementa notablemente, hecho que ha sido atribuido a la disminución de los estrógenos circulantes [5]. Se postula que el efecto cardioprotector del estradiol se debe a su acción sobre el metabolismo lipoproteico y vascular. La terapia hor-

monal de reemplazo con estrógenos o combinada estrógenos/progestágenos constituye una alternativa terapeutica de mejorar la expectativa y calidad de vida de este grupo poblacional [6].

La función vascular es regulada por diferentes agonistas entre ellos las hormonas ováricas estradiol y progesterona. Las hormonas esteroides actúan a través de dos mecanismos de acción: genómico (regulación de la transcripción génica) o no genómico (asociado a sistemas de transducción de señales intracelulares) [7].

Se encuentra ampliamente documentado que el estradiol (E_2) ejerce un efecto directo sobre la vasculatura regulando la actividad COX y NOSe a través de mecanismos de acción genómico y no genómico, que comprenden la participación del receptor de estradiol alfa (ER alfa), y sistemas mensajeros mediado por protein quinasa activada por GMPc (PKG), protein quinasa C (PKC) y protein quinasa activada por mitógenos (MAPK) [8]. Sin embargo no existe en la literatura datos sobre la participación de la estrona (E_1) en la regulación del metabolismo vascular. La E_1, segundo estrógeno con actividad biológica relevante, proviene predominantemente de la conversión periferica de su precursor suprarrenal androstenediona y en menor proporción de la contribución ovárica [9]. En la menopausia, se produce una marcada declinación de los niveles circulantes de E_2, mientras que la concentración sérica de E_1 se mantiene.

En nuestro laboratorio, utilizando anillos de aorta aislados de ratas hembras en edad fértil (REN) hemos demostrado que Pg y 17-beta-E_2 estimulan la actividad NOS y COX e inhiben la agregación plaquetaria en forma NO dependiente. El mecanismo de acción descripto es de tipo no genómico, se manifiesta a concentraciones fisiológicas y es específico de sexo y para hormonas ováricas [10]. Obtuvimos evidencia de una interregulación entre las vías mensajeras activadas por Pg [11]. Cuando se utilizó tejido aórtico proveniente de ratas envejecidas sin función ovárica (REB), o ratas bilateralmente ovariectomizadas (OVX) los efectos estimulatorios de los tratamientos "in vitro" con 17 β-estradiol y progesterona desaparecen [12].

Con respecto a la estrona comprobamos [13] que el tratamiento "in vitro" por tiempos cortos, con diferentes concentraciones de esta hormona (10^{-8}M - 10^{-10}M) incrementa la actividad NOS de anillos de aorta aislados de ratas en edad fértil.

Teniendo en cuenta nuestros resultados previos, en el presente trabajo nos propusimos estudiar el mecanismo de acción no genómica de estrona en tejido aórtico de ratas REN y compararlo con el del 17 β-estradiol.

Materiales y Métodos

Materiales

^{3}H-arginina y ácido ^{3}H-araquidónico fueron adquiridos en New England Nuclear (Chicago). La resina de intercambio iónico Dowex AG 50WX8 de Bio Rad Laboratories, (California). Las placas de silica gel para cromatografía en capa fina fueron adquiridas en Merck KgaA (Alemania). Estrona , el 17β-estradiol, la superóxido dismutasa (SOD), y otros reactivos son de Sigma (St. Louis, MO).

Animales

Se utilizaron ratas hembra (cepa Wistar) sexualmente maduras y en período fértil (6 a 8 meses de edad). Todas habían tenido más de tres estros consecutivos comprobados con citología exfoliativa. Los animales fueron alimentados con dieta estándar para roedores, con provisión de agua “ad libitum”, y mantenidos con ciclos de 12 hs. luz/oscuridad.

Sistema experimental

Se emplearon anillos aislados de aorta de rata (RAS) con niveles normales de estrógenos y procesados como se describió previamente [10]. Brevemente, los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Inmediatamente se extrajo la aorta, se colocó en una solución salina Dulbeco tamponada (DPBS), se limpió de tejidos adherentes y se cortó en anillos de 5 mm de ancho. Todo el procedimiento se hizo tomando precauciones para no dañar el endotelio. Los anillos se colocaron en un medio de incubación conteniendo (NaCl 125.4 mM; KCl 5.9 mM; $MgCl_2$ 1.2 mM; $CaCl_2$ 1.5 mM; glucose 11.5 mM; Hepes 10 mM pH: 7.35) se equilibró durante 15 minutos en un baño con agitación termostatizado a 37 °C.

Para cada experimento descripto se utilizaron anillos de aorta aislados de 3 animales.

Determinación de la inhibición de la agregación plaquetaria:

Se procedió como se describió previamente [10]. Los anillos de aorta se incubaron en 400 µl plasma rico en plaquetas (conteniendo 3 x 10^{-8} plaquetas/ml) (PRP), en un baño termostatizado a 37º C, y se trató con las hormonas a concentraciones indicadas y por intervalos cortos de tiempo (1-5 min). Los grupos controles fueron tratados con vehículo solamente (etanol < 0,1 %). Se agregó SOD (60 U/ml) al medio de incubación [14], antes del tratamiento hormonal para evitar la degradación del NO producido. Inmediatamente después del tratamiento, se tomaron 285 µl del PRP y se colocaron en la cubeta del agregómetro CronoLog 430. Se inició la agregación plaquetaria con el agregado de adenosina difosfato (ADP) 10^{-5} M. Se registraron los cambios en la transmisión de luz en un intervalo de 5 minutos. La señal generada en un plasma pobre en plaquetas sirvió como control transparente (100% transmisión) [15]. Los anillos aórticos se disolvieron con NaOH 1 N y se tomaron alícuotas para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry [16]. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria por mg de proteína. La agregación plaquetaria máxima se consideró aquella inducida por las muestras control. Se constató que todos los compuestos usados para el tratamiento del tejido no tenían efecto directo sobre la agregación plaquetaria.

Determinación de la producción de NO

Se determinó utilizando la técnica de conversión de ^{3}H arginina en ^{3}H citrulina [17]. El tejido aórtico se preincubó por 15 minutos a 37°C con buffer D compuesto por (NaCl 145 mM; KCl 5.0 mM; $MgSO_4$ 1.2 mM; $CaCl_2$ 1.0 mM; glucose 10 mM; Hepes 10 mM pH: 7.35), y se marcó con ^{3}H-arginina 10 ❍M (5µCi) durante 10 min. en baño termostatizado con agitación constante. Luego se expuso el tejido a los diferentes tratamientos hormonales. Cuando se usó indometacina ésta se agregó al medio de incubación 10 minutos antes del tratamiento con las hormonas. Se procesaron en todos los casos los controles respectivos a los que se los trata con vehículo (etanol<0.1 %). Luego del tratamiento los anillos de aorta se lavaron con medio sin marcación y fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido. El tejido fue homogeneizado a 4º C en medio conteniendo ácido N-2 hidroxietil piperazinaN-2 etansulfónico (HEPES) 20m M con ácido etilén diamino tetracético (EDTA) 2 m M durante 45 segundos, se centrifugó a 2500 x g por 20 minutos y el sobrenadante se aplicó a una columna de intercambio iónico Dowex AG 50W8. La citrulina se eluyó con 2 ml de agua y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido [11].

Determinación de la producción de eicosanoides

Los anillos de aorta se premarcaron con Ácido ^{3}H-araquidónico (0,3 µCi/ml) durante 90 minutos, luego se lavaron con solución D y se transfirieron a un medio de incubación fresco para efectuar los tratamientos hormonales en las condiciones experimentales adecuadas. Inmediatamente después del tratamiento se retira el tejido y el medio de incubación se acidificó con ácido cítrico 1M y se extrajo cuatro veces con 0,5 ml de acetato de etilo. Se recolectaron todos los extractos y se evaporaron bajo atmósfera de nitrógeno. Los eicosanoides se separaron con cromatografía en capa fina unidimensional [18] usando acetato de etilo/isooctano/ácido acético/agua (66:30:12:60) como solvente de desarrollo y yodo como revelador. Se determinaron los Rf de las respectivas muestras y estándares, se rasparon las fracciones correspondientes a ^{3}H6-ceto-PGF1♋ (metabolito estable de PGI_2) y ^{3}H Tromboxano B_2 (metabolito estable del TxA_2), se contó la radioactividad de ambas fracciones y los resultados se expresaron como porcentaje del total de ^{3}H-eicosanoides [11].

Análisis estadístico

Se utilizó el test t de Student con un nivel de significación $P< 0.05$. Cada condición experimental se reprodujo al menos en tres experimentos independientes.

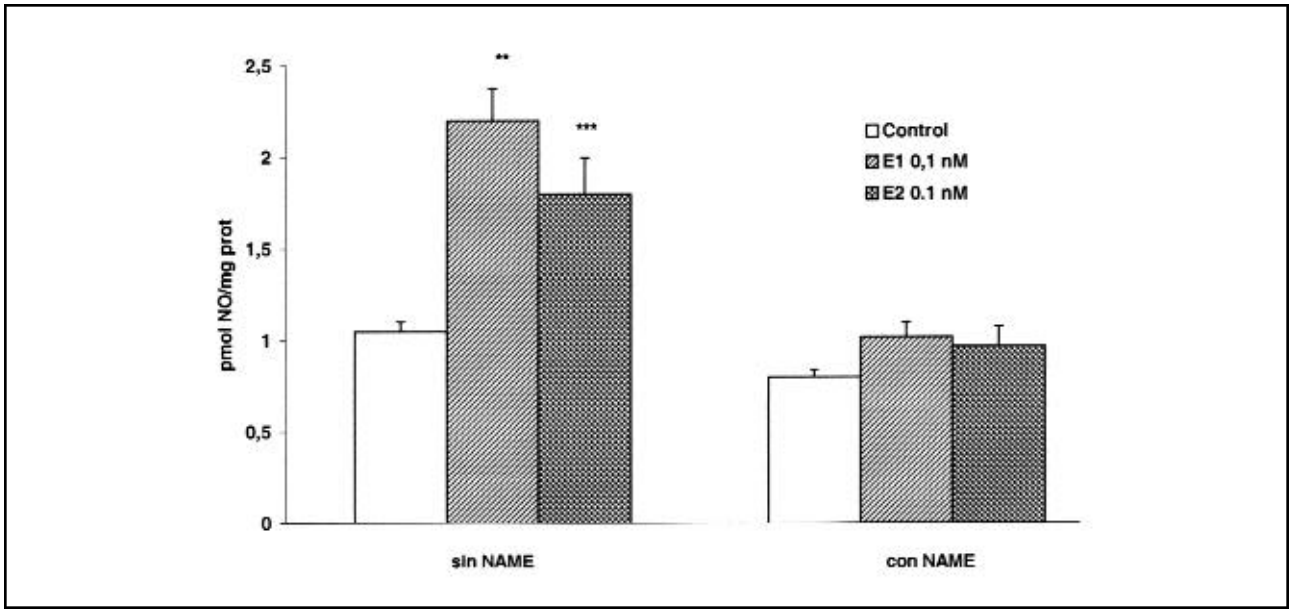


Fig. 1. Supresión por L-NAME de la estimulación de la producción de NO por Estrona y Estradiol: Anillos de aorta de rata fueron marcados con 10 ❍M ^{3}H-arginina (5 ❍Ci) durante 10 minutos a 37ºC en presencia o ausencia de 10 ❍M L-NAME y luego se trataron 5 min con Estrona, 17$\delta\zeta$-estradiol o etanol (control). La producción de NO se midió como se describe en métodos. Los resultados son promedios ± DE de 3 experimentos independientes (n=4). ** P< 0.025, ***P<0.01.

Resultados

Iniciamos nuestros estudios evaluando el efecto de estradiol o estrona sobre la actividad NOS en presencia o ausencia de L-NAME, inhibidor específico de la NOS. Como puede observarse en la Fig. 1 el tratamiento del tejido vascular con estrona (0,1 nM) incrementa significativamente la producción de NO (1,05 ± 0.05 vs 2,2 ± 0.18 pmol NO/mg prot, control y estrona respectivamente, P<0.01), siendo este efecto ligeramente superior al del estradiol (109 y 72 % de estímulo sobre el control). El estímulo inducido por ambas hormonas fue totalmente abolido por L-NAME, demostrándose así la especificidad del ensayo utilizado.

Es sabido que la activación de la NOS endotelial inducida por estradiol es dependiente de calcio [19], por lo tanto evaluamos si el incremento en la producción de NO inducido por las hormonas era dependiente del aporte de calcio del medio extracelular. RAS se incubaron con 0.1 nM E_2 ó E_1, durante 5 minutos en presencia de EGTA (quelante de calcio externo). La Fig. 2 muestra que, el estímulo en la producción de NO inducido por la estrona no es afectado por EGTA (2.08±0.20 s/EGTA vs 2.15 ± 0.22 pmol/mg prot con EGTA respectivamente) sugiriendo que la activación NOS dependiente de estrona no requiere de la entrada de calcio al tejido. Por el contrario, el estímulo inducido por 17$\delta\zeta$-estradiol fue completamente suprimido por el quelante de calcio (2.20 ± 0.26 s/EGTA vs 0.9 ± 0.11 pmol/mg prot con EGTA).

En nuestro laboratorio demostramos que el NO producido por anillos de aorta de rata tratados con concentraciones fisiológicas de estradiol o progesterona inhiben la agregación plaquetaria de un plasma rico en plaquetas (PRP) [10]. Por consiguiente se procedió a medir la agregación plaquetaria inducida por ADP de un PRP previamente incubado con RAS expuestos durante 1 minuto a 0.1-10 nM E_1 o E_2. Se observa que, si bien la E_1 inhibe la agregación plaquetaria, su efecto es de menor magnitud que el de E_2. En la Fig. 3 se muestra que el estradiol exhibe una acción antiagregante de mayor magnitud que la estrona (30 ± 4,5 ; 50 ± 7,2

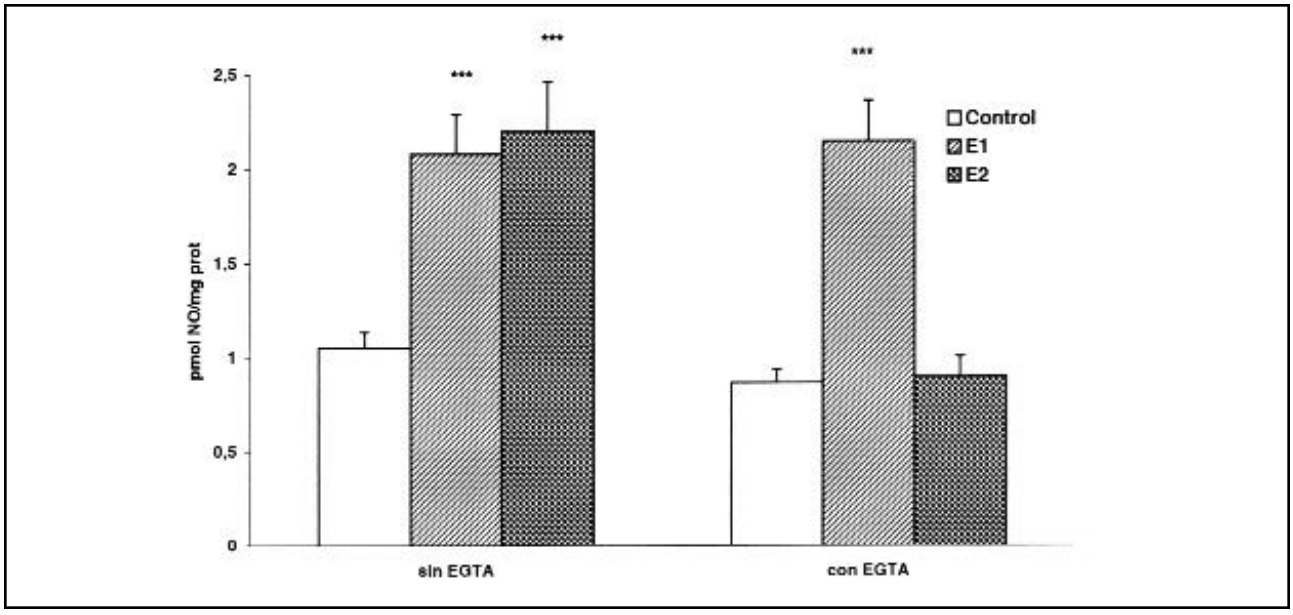


Fig. 2. Efecto de la depleción de Ca++ del medio extracelular sobre el estímulo en NO inducido por Estrona y Estradiol: Anillos de aorta de ratas REN se premarcaron con 10 ❍M ^{3}H-arginina (5 ❍Ci) durante 10 minutos a 37ºC y luego se expusieron durante 5 minutos a estrona o 17δ-estradiol 0,1 nM en presencia o en ausencia de EGTA (0,5mM). Se midió la ^{3}H-citrulina como se describe en métodos. Los resultados son promedios ± DE de 3 experimentos independientes efectuados por cuadruplicado.*** P< 0,01 .

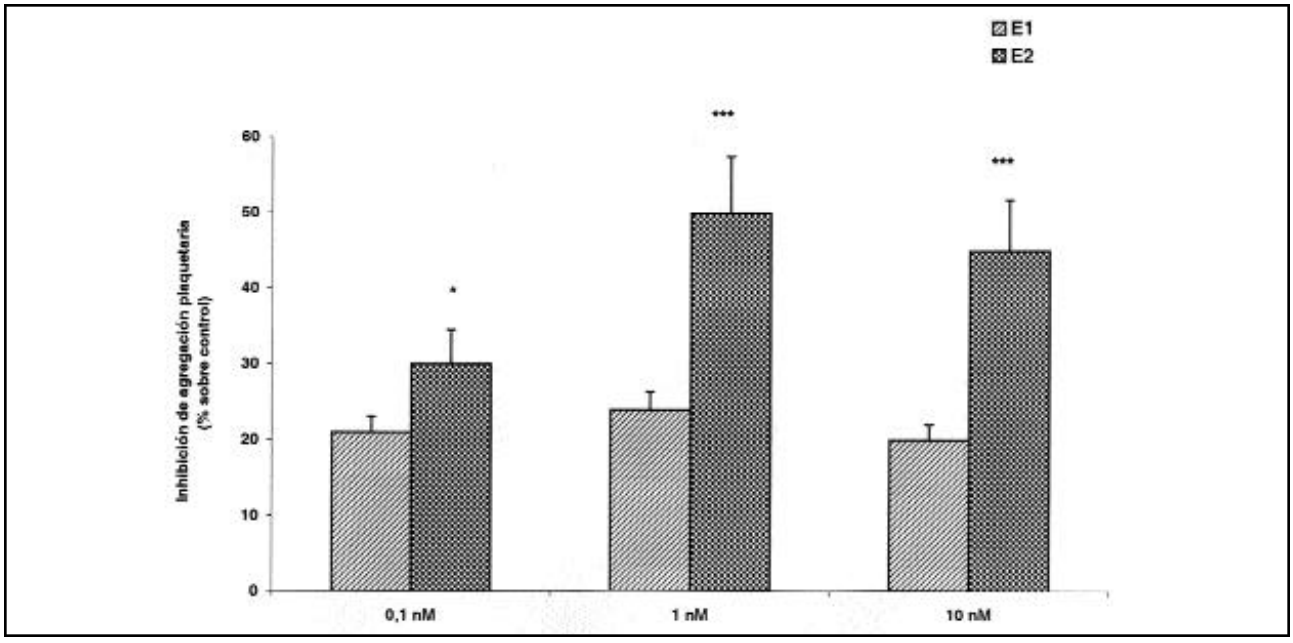


Fig. 3. Efecto de la estrona y estradiol sobre la inhibición de la agregación plaquetaria: Anillos de aorta se incubaron en 400 ❍l de PRP con Estrona o 17δ-estradiol (0,1 - 10 nM) durante 1 min. Se midió la agregación plaquetaria inducida por ADP 10^{-5} M como se describe en métodos. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición de la agregación de las plaquetas con respecto al control (aorta tratada con vehículo). Los resultados representan las medias ± DE de 4 experimentos independientes. *P<0.05, *** P<0.01.

y 45 ± 6,7 % vs 20 ± 2,1 ; 25 ± 2,3 y 20 ± 21% respectivamente).

Teniendo en cuenta que el proceso de activación y agregación plaquetaria [20] es también modulado por los eicosanoides prostaglandinas y tromboxanos, se estudió el efecto de estrona y estradiol (1-10 nM) sobre la producción de prostaciclina (PGI_2). Se obtuvo evidencia que ambos estrógenos incrementan la síntesis de ^{3}H-6ceto-PGF 1♋, siendo la acción estimulatoria de la estrona mayor que la del 17♌ estradiol, (tabla 1). Respecto a los niveles de tromboxanos liberados al medio de incubación luego de 5 minutos de tratamiento con las hormonas, en la Fig. 4 podemos observar que la estrona incrementa significativamente la producción de ^{3}H-TxA_2 con respecto al control (85 y 145 %). El efecto de la hormona es dosis dependiente. Por el contrario, el estradiol no modificó la producción de tromboxano por parte del tejido vascular.

	% de distribución ^{3}H-6ceto-PGF 1alfa	% Incremento respecto al control
Control	3.05 (± 0,62)	
Estrona 1 nM	5.67 (± 1,24)	86*
Estrona 10 nM	5.76 (± 1.62)	89***
Estradiol 1 nM	4.05 (± 0,79)	33*
Estradiol 10 nM	5.06 (±1.02)	60**

Tabla 1. Estimulación de la producción de PGI_2 inducida por E_2 y E_1: Anillos de aorta de rata se premarcaron con ^{3}H- araquidonato (0.3 ❍Ci) durante 90 minutos a 37ºC. Luego se expusieron a E_2 y E_1 a concentraciones indicadas durante 5 minutos. Se midió la producción de PGI_2 como se describe en métodos. Los resultados son promedio + DE en 4 experimentos efectuados por triplicado. *P<0.05, **P<0.025, ***P<0.01.

Teniendo en cuenta la acción antiagregante plaquetaria del Tromboxano, y nuestras observaciones que mostraban que la estrona ejerce un débil efecto antiagregante (Fig. 3), se midió el efecto de la estrona sobre la agregación plaquetaria en presencia o ausencia de indometacina, inhibidor de la ciclooxigenasa. Como se muestra en la Fig. 5 al suprimir la actividad COX la estrona induce una inhibición de la agregación plaquetaria equivalente al estradiol.

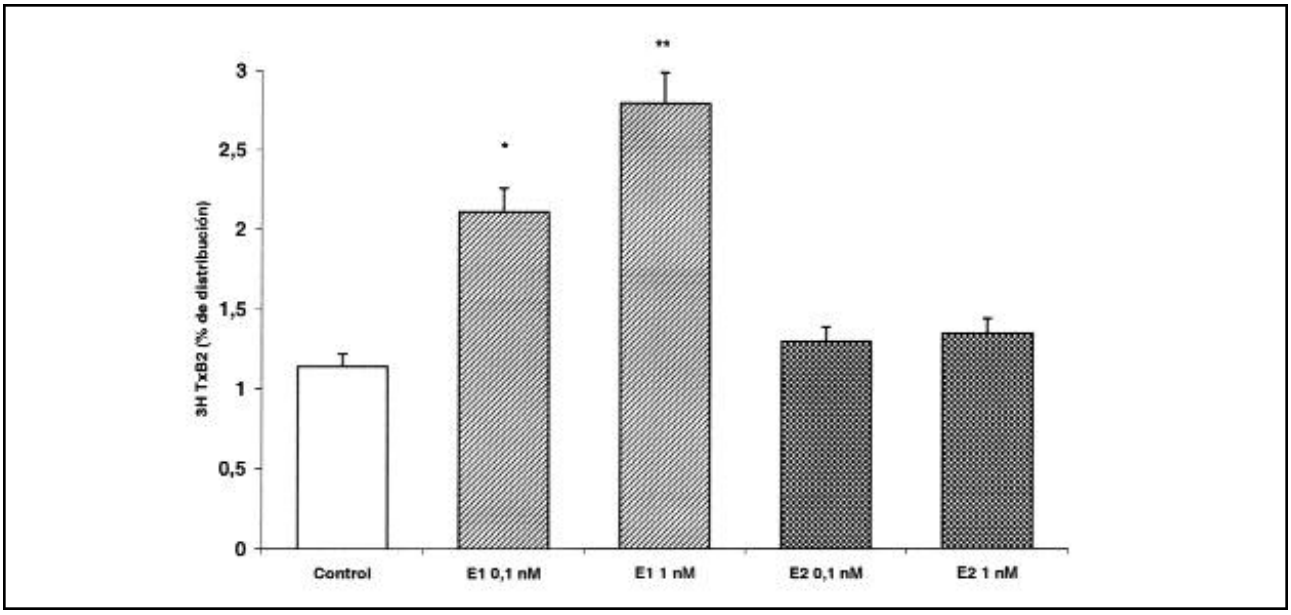


Fig. 4. Efecto de E_2 y E_1 sobre la síntesis de Tx: Anillos de aorta de rata se premarcaron con ^{3}H- araquidonato (0.3 ❍Ci) durante 90 minutos a 37ºC. Luego se expusieron durante 5 minutos a E_2 y E_1 a las concentraciones indicadas. Se midió la producción de PGI_2 como se describe en métodos. Los resultados son promedio ± DE de 3 experimentos efectuados por cuadruplicado. * P<0.05, **P<0.025

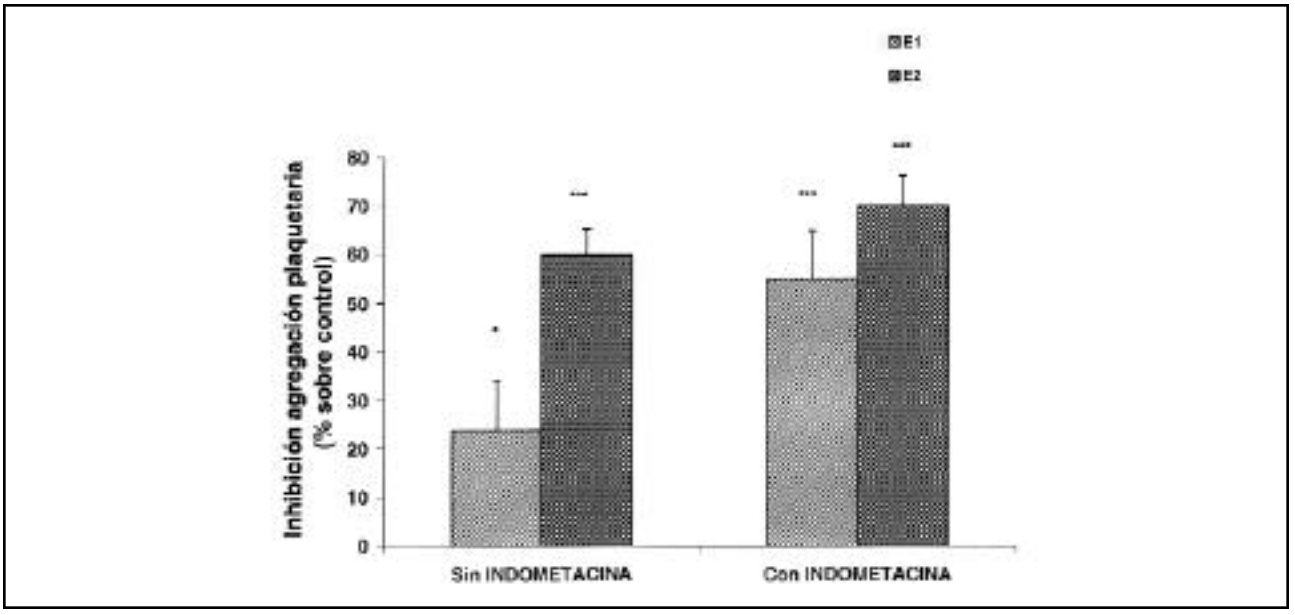


Fig 5. Efecto de Indometacina 10 uM sobre la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por E $_1$: Anillos de aorta de rata, se incubaron durante 1 minuto en 400 ❍l de PRP con 1 nM E_1 o E_2. Se midió la agregación plaquetaria, como se describe en métodos. Los resultados se expresan como % de inhibición de la agregación plaquetaria respecto al control (aorta tratada con vehículo) y representan las mediciones ⊠DE de 3 experimentos independientes. *P< 0.05, ***P<0.01

Discusión

En este trabajo demostramos por primera vez que la estrona actúa en forma directa a nivel de la pared arterial, regulando el metabolismo vascular al igual que el estradiol, aunque por mecanismos diferentes. Obtuvimos evidencia que la estrona estimula la actividad NOS en forma no genómica e independiente del aporte de calcio del medio extracelular, y que también modula la actividad COX incrementando la producción de Tx y PGI_2. En cambio, el estradiol regula la actividad NOS en forma dependiente de calcio y actúa sobre el metabolismo eicosanoide produciendo sólo aumentos en la producción de prostaciclina. Ambas hormonas difieren también en la modulación de la agregación plaquetaria (AP). El 17♌-estradiol ejerce una potente acción antiagregante, efecto dependiente de la producción de NO [10]. Por el contrario, la modulación de la AP por parte de la estrona depende del balance entre la producción de proagregantes (Tx) y antiagregantes (NO y PGI_2), siendo necesario suprimir la vía de los eicosanoides con indometacina para lograr un efecto inhibitorio de la AP equivalente al estradiol.

El NO a nivel vascular se comporta como un verdadero segundo mensajero intracelular, exhibiendo propiedades hemodinámicas y antiaterogénicas [21]. Se ha demostrado que este radical libre regula el tono vascular induciendo vasodilatación arterial [22], previene la adhesión de los monocitos a la superficie endotelial [23], impide la agregación y adhesión de plaquetas [24], e impide la formación de neoíntima [25]. Está ampliamente demostrado que el 17-beta estradiol participa en la modulación de todos estos eventos ya sea en forma directa o a través de la activación de la NOS por mecanismos de acción genómicos y no genómicos [8]. Nuestros resultados evidencian que el estradiol induce activación de una isoforma de NOS que es dependiente de calcio. En cambio los incrementos en NO que hallamos para estrona son independientes del influjo de calcio extracelular. En futuros estudios evaluaremos si la especie molecular de NOS activada por estrona es regulada por el aporte de calcio proveniente de depósitos intracelulares y qué tipo de isoforma NOS

es la que media la acción de esta hormona en nuestro sistema experimental.

El mantenimiento del tono vasomotor es regulado por la PGI_2. Este factor se produce en el endotelio y actúa sobre la CMLV a través de la inhibición de la síntesis de endotelina 1 [26] y de la fosforilación e inactivación de la proteína contráctil miosina. Hemos demostrado que ambos estrógenos estimulan significativamente la producción de prostaciclina, a tiempos muy cortos de tratamiento (5 minutos), siendo la estrona la que genera un estímulo de mayor magnitud. Se ha reportado que en células endoteliales en cultivo, la estrona produce un incremento en la síntesis de PGI_2 luego de 18 horas de tratamiento a concentraciones suprafisiológicas, lo cual sugeriría la participación de un mecanismo de acción de tipo genómico [27].

La COX es la enzima responsable de metabolizar el ácido aráquidonico transformándolo en los endoperóxidos PGG_2 y PGH_2, los cuales en una segunda etapa son catalizados por la prostaciclin sintasa (PGIasa) y la tromboxano sintasa (Txasa) para dar origen a la prostaciclina y tromboxano A_2 respectivamente [28]. Nuestros resultados demuestran que, solamente la estrona afecta la síntesis de Tx. Esto podría ser explicado por un efecto diferencial de ambos estrógenos sobre las enzimas PGIasa y Txasa, lo cual es objeto de nuestras actuales investigaciones.

Finalmente, en relación a la AP, es importante destacar que constituye uno de los eventos iniciales del proceso de aterogénesis y de trombosis, ya que luego de producida la disfunción endotelial y posterior activación produce una atracción de las plaquetas y monocitos hacia el endotelio, desencadenando una serie de eventos que culminan con la formación de la placa ateromatosa y la ruptura de esta placa lleva a la trombosis en el vaso afectado. En la menopausia, el riesgo de accidentes cardiovasculares por aterotrombosis se incrementa notablemente, hecho que ha sido atribuido exclusivamente a la pérdida de estradiol.

Nos preguntamos ¿qué rol cumple la estrona, en este período?. Si este estrógeno es capaz de regular la actividad de enzimas claves como NOS, COX, PGIasa y Txasa, se plantea el interrogante sobre qué sucede con dicho efecto en la posmenopausia. El hecho que la estrona ejerce un efecto significativo sobre la inhibición de la AP pero que requiere de la supresión de la vía COX, sugeriría que la acción de este estrógeno sobre la producción de agentes proagregantes es un factor relevante.

Agradecimientos

Este trabajo contó con el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas Técnicas (CONICET) y fue subsidiado por la Universidad Nacional de Sur (PGI 24/B047).

Bibliografía

1. Moncada, S.; Pamer, R.; Higgs, E. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol. Res. 43: 109-142, 1991
2. Michel, T.; Li, G.; Busconi, C. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6252-6256, 1993
3. Knowles, R.; Moncada, S. Nitric oxide synthase in mammals. Biochem. J. 298: 249-258, 1994.
4. Oravee, S.; Demuth, K.; Myara, I. y col. The effect of high density lipoprotein subfractions on endothelial eicosanoid secretion. Thrombosis Research 92: 65-71, 1998. White M., Zamudio.
5. Knopp, R.; Zhu, X.; Bonet, B. Effects of estrogens lipoprotein metabolism and cardiovascular disease in women. Atherosclerosis 110: 583-591, 1994.
6. Psaty, P.; Heckert, S.; Atkins, D. y col. The risk of myocardial infarction associated with the combined used of estrogen and progestins in postmenopausal women. Arch, Intern. Med. 154: 1333-1339, 1997.
7. Falkenstein, E.; Tillman, H.; Christ, M. y col. Multiple actions of steroid hormones, a focus on rapid non genomic effects. Pharmacol. Rev. 55: 513-556, 2000.
8. Mendelsohn, M.; Karas, R. The protective effects of the estrogen on the cardiovascular system. The New Eng.J. Med.340: 1801-1811, 1999
9. Hemssell, P.; Graden, J.; Brenner P. y col. Plasma

precursors of estrogen II. Correlation of the extent of conversion of androstenedione to estrone with age. Clin. Endocrinol. Metab. 38:476-479,1974
10. Sellés, J.; Polini, N.; Alvarez, C. y col. "Progesterone and 17 β-estradiol stimulate nitric oxide syntase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation" Life Scienes 69:815-827, 2001.
11. Sellés, J.; Polini, N.; Alvarez, C. y col. Non-genomic action of progesterone in rat aorta: role of nitric oxide and prostaglandins. Cell. Signalling, 14(5): 431-436, 2002
12. Massheimer, V.; Polini, N.; Alvarez, C. y col. 17-beta estradiol rapid stimulation of rat aorta NOS activity is prevented by estrogen deficiency. Maturitas, The European Menopause Journal 43: 55-64, 2002.
13. Massheimer, V.; Mendiberri, J.; Alvarez, C. y col. La estimulación con estrona o progesterona de la óxido nítrico sintasa (NOS) de tejido aórtico de rata se modifica por deficiencia de hormonas ováricas. Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol. 38 Nº1 pg 160, 2001
14. Gryglewski, R.J.; Palmer, R.M.J.; Moncada, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium derived vascular relaxing factor. Nature 1986; 320: 454-456, 1986.
15. Kikuta, K.; Sawamura, T.; Miwa, S. y col. High affinity arginine transport of bovine endothelial cells is impaired by lysophosphsatiddylcholine Circ. Res. 83:1088-1096, 1998.
16. Lowr y, O.H.; Rosebrough, N.J.; Far r, A.L. y col. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol.Chem. 1951; 195:265-277, 1951.
17. Hayashi, T.; Yamada, K.; Esaki, T. y col. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor mediated system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995; 214:847-855, 1995.
18. Salmon, J.; Flower, R. Extraction and Thin layer Chromatography of arachidonic acid metabolites. Methods in Enzymology, Academic Press 86: 477-493, 1982.
19. Chen, Z.; Yuhamma, I.; Calcheva-Gargova, P. y col. Estrogen receptor alpha mediates the non-genomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. J Clin Invest 103:401-406, 1999
20. Linton, M.F.; Fazzio, S. Cyclooxigenase-2 and atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 13:497-504, 2002
21. Joswig, M.; Wunderle, V.; Ziegler, R. y col. Postmenopausal hormone replacement therapy and the vascular biology. Exp Clin. Endocrinol Diabetes 107: 477-487, 1999
22. Garg, U. and Hassid, A. Nitric oxide generation vasodilators and 8-bromo cyclic guanosine monophospate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J.Clin.Invest. 83: 1774-1777, 1989
23. Kubes, P.; Suzuki, M.; Granger, D. Nitric oxide an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 88: 4651-4655, 1991.
24. Radomski, M.; Palmer, R.; Moncada, S. An L-arginine - nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation Proc. Natl. Acad. Sci, USA 87: 5195-5197, 1990
25. von der Leyen, H.; Gibbons, G.; Morishita, R. y col. Gene therpapy inhibition neointimal vascular lesion in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 92: 1137-1141, 1995.
26. Haynes, W.; Webb, D. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. Journal of Hypertension 16: 1081-1098, 1998.
27. Seeger, H.; Mueck, A.O.; Lippert, T.H. "Effect of estradiol metabolites on prostacyclin synthesis in human endothelial cell cultures". Life Sciences 65:167 - 170, 1999.
28. Dogne, J.; Leval, X.; Delarge, J. y col. New trends in thromboxane and prostacyclin modulators. Curr. Med. Chem, 7: 609-628, 2000.

"La envidia es el gusano roedor del mérito y de la gloria".

FRANCIS BACON

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol 40 • No. 1
Copyright © 2003 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo

TRABAJO ORIGINAL

Identificación de una Transversión Heterocigota 1357C>A (P453T) en el Exón 10 del Gen del Receptor de Hormonas Tiroideas β en una Familia con Resistencia a Hormonas Tiroideas.

Identification of an Heterozigous 1357C>A Transversion (P453T) in Exon 10 of Thyroid Hormone Receptor β Gene in a Family with Resistance to Thyroid Hormone

Rivolta, C. M.[1]; Feijoo, M. C.[2]; Targovnik, H. M.[1]*; Funes, A.[2]

[1] Laboratorio de Biología Molecular, Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 1120 - Buenos Aires, Argentina.
[2] Servicio de Endocrinología, Hospital Interzonal General de Agudos "Eva Perón", 1650 - San Martín, Argentina.

Resumen

El síndrome de resistencia a hormonas tiroideas (RTH) se caracteriza por una disminución de la respuesta a las hormonas tiroideas por parte de los tejidos y se debe a mutaciones en la isoforma β del receptor de hormonas tiroideas (THRβ). Las moléculas THRβ defectivas interfieren con la función de los receptores normales produciendo este síndrome con modo de herencia autosómico dominante. El paciente evaluado, una mujer de 16 años, acudió a la consulta por bajo peso, nerviosismo, palpitaciones, hipersudoración y bocio difuso. Las pruebas bioquímicas revelaron elevada T_4 libre de 3,61 ng/dl (valores normales: 0,7-2,3), T_3 total de 352 ng/dl (valores normales: 80-200) y TSH no suprimida de 0,99 mU/L (valores normales: 0,32-5,0). Su padre y sus dos hermanas también tenían hallazgos bioquímicos compatibles con RTH.

El diagnóstico de RTH fue confirmado por la secuenciación del gen THRβ. En el exón 10 se identificó una transversión heterocigota (1357C>A) resultando en la sustitución de prolina por treonina (P453T). Esta alteración estaba presente en la paciente, en su padre y dos hermanas.

La técnica de "Single Strand Conformation Polymorphism" (SSCP) fue empleada para validar dicha mutación.

La sustitución P453T caracterizada aquí constituye el segundo caso de mutación en el gen de THRβ, identificada en población argentina.

Dirección postal: Dr. Héctor M. Targovnik, Laboratorio de Biología Molecular, Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Av. Córdoba 2351, 4to piso - sala 5 (1120) Buenos Aires, Argentina. Tel.: 54-11-4964-8296; Fax: 54-11-4508-3645; E-mail: htargovn@huemul.ffyb.uba.ar
Palabras clave: Receptor de hormonas tiroideas; THRβ; Resistencia a hormonas tiroideas; RTH; mutación.
Key words: Thyroid Hormone Receptor; THRβ; Thyroid Hormone Resistance; RTH; Mutation.

Abstract

The syndrome of resistance to thyroid hormone (RTH) is characterized by an variable tissue hyposensitivity to thyroid hormone [1-14]. Different mutations located in the ligand-binding (LBD) or hinge domains of the thyroid hormone receptor β (THRβ) gene have been identified in the RTH phenotype [15-31]. Consistent with the dominant mode of transmission, mutant THRβs interfere with the function of the wild type receptor by a dominant negative mechanism [32-35].

The affected individuals display unsupressed TSH levels despite elevated serum free T_4 and T_3, reflecting resistance to the normal negative feedback mechanisms within the hypothalamus and pituitary [5]. RTH patients are clinically euthyroid or even hypothyroid depending on the severity of the mutation [5-8].

We describe the clinical and molecular analysis of a family with RTH. The propositus, a 16-years-old woman, came to medical attention because of weight loss, nervousness, palpitations and excessive sweating. Those symptoms were associated with a difuse goiter. Biochemical tests revealed an elevated free T_4 of 3.61 ng/dl (normal range, 0.7-2.3), a total T_3 of 352 ng/dl (normal range, 80-200), and a non-supressed TSH of 0.99 mU/L (normal range, 0.32-5). Administration of exogeneous T_4 or T_3 did not result in the usual TSH suppression, leading to the clinical diagnosis of RTH. Her father and two sisters also had biochemical findings compatible with RTH (Table 1).

The diagnosis of RTH was confirmed by sequencing the THRβ gene. An heterozigous transversion 1357C>A was identified in exon 10 resulting in substitution of proline 453 by treonine (P453T). This change was present in the propositus, her father and sisters (Figure 1).

Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) was used to validate the mutation found. So, the product of PCR corresponding to exon 10 of the propositus was electrophoresed in a 10% polyacrylamide gel next to the fragments obtained from 8 normal and no related controls. The silver staining revealed the presence of two fragments in the patient corresponding one of them to the allele carrying the mutation and the other to the normal allele (Figure 2). No mutations were identified in exon 9 of the THRβ gene. The substitution P453T in the first domain of the LDB of the THRβ gene characterized in this work is the second mutation identified in argentine population. The molecular diagnosis of RTH is important to determinate the appropriate treatment in those symptomatic patients to ameliorate features of hyper or hypothyroidism.

Introducción

La resistencia a hormonas tiroideas (RTH) se caracteriza por una disminución de la respuesta a las hormonas tiroideas por parte de los tejidos [1-4]. La incidencia de RTH es de 1 caso cada 50.000 nacidos vivos, con más de 600 casos conocidos [5-7]. El síndrome es definido por una elevación de las hormonas tiroideas libres y un nivel normal o elevado pero inapropiado de tirotrofina. El cuadro clínico es muy variable e incluye bocio, signos de hipertiroidismo e hipotiroidismo, baja estatura, deficiencia en la maduración ósea e hiperactividad con déficit de atención [8,9].

Las hormonas tiroideas tienen acciones estimuladoras e inhibidoras sobre un cierto número de genes [5]. Estas acciones son mediadas por receptores nucleares que se unen a la T_3 [10-12]. El receptor a T_3 pertenece a una super familia de proteínas, la familia c-erbA, que incluye a los receptores para glucocorticoides, mineralcorticoides, estrógeno, vitamina D y ácido retinoico. Los diferentes miembros de esta familia de proteínas presentan una homología estructural y de la secuencia aminoacídica como también similitudes funcionales. Estos receptores se caracterizan por poseer dos dominios bien diferenciados, un dominio amino-terminal para la unión con el ADN llamado DBD (DNA Binding Domain) y un dominio carboxilo-terminal para la unión a la hormona denominado LBD (Ligand Binding Domain) [5-7]. El receptor de T_3 se une con secuencias específicas del ADN llamados TRE (Thyroid Hormone Response Elements) usualmente localizados cerca del sitio de inicio de la transcrip-

ción de los genes regulados por la hormona. El receptor forma un heterodímero con el RXR (Retinoid X Receptor) y a su vez el complejo se une al TRE. Proteínas coactivadoras pueden mediar los efectos transcripcionales del receptor, al actuar sobre el complejo de iniciación de la transcripción formado por el TFIIB (Transcriptor Factor IIB), el TBP (TATA Binding Protein) y la ARN polimerasa, asociados al promotor TATA box. La activación ocurre por la unión de la T_3 al dominio LBD, produciendo finalmente la modulación de la transcripción del gen efector. La acción final puede ser de activación o represión de la transcripción [5].

Existen dos genes que codifican a los receptores de hormonas tiroideas, el gen THRα (Thyroid Hormone Receptor α) se encuentra en el cromosoma 17 y el gen THRβ (Thyroid Hormone Receptor β) en el cromosoma 3, cada uno de estos genes originan varias isoformas del receptor, las cuales son llamados respectivamente, THRα1 y THRα2 y THRβ1 y THRβ2 [5-7]. La RTH está asociada a mutaciones en el gen THRβ [13] en forma autosómica dominante, por el contrario ninguna mutación pudo ser identificada en el gen THRα, sugiriendo que sus productos juegan un rol menor como receptores o que los defectos del THRα son letales y como lógica consecuencia incompatibles con la vida. El gen THRβ comprende 370 Kb, las secuencias codificantes están repartidas en 10 exones [5-7,14] y genera dos ARNm diferentes por "splicing" alternativo, los receptores THRβ1 y THRβ2. El gran tamaño del gen es debido a los grandes intrones que posee. Los mensajeros presentan una compleja estructura. El ARNm del THRβ1 tiene 1698 nucleótidos, está integrado por los 10 exones del gen y codifica una proteína de 461 aminoácidos. El ARNm del THRβ2 tiene 1628 nucleótidos provenientes de parte del exón 4, donde se encuentra el sitio de "splicing" para el THRβ2 y los exones completos del 5 al 10.

Las mutaciones más frecuentes originan substitución de un aminoácido. Se ha publicado una familia con deleción completa de la secuencia codificante del gen THRβ y también otros casos donde el tipo de mutación es por inserción con cambio del marco de lectura o deleción de aminoácidos [15-31]. La mayoría de las mutaciones se localizan en el dominio LBD del THRβ, más precisamente en los exones 9 y 10, resultando en una reducción de la afinidad de la T_3 al receptor. En los genes regulados positivamente por la T_3 el efecto dominante negativo ocurre por la formación de un complejo entre el receptor mutado y los corepresores nucleares con supresión de la transcripción [32-35]. Por el contrario, en los genes regulados negativamente, como son los genes TSHα y β, el complejo entre el THRβ mutante y los corepresores activan la transcripción. En la familia en la cual la mutación que origina la resistencia es debida a una deleción completa de la región codificante del gen THRβ la herencia es autosómica recesiva [19]. Los tres miembros afectados de esta familia presentan la deleción en los dos alelos (materno y paterno) mientras que el gen THRα está presente. Observaciones recientes muestran casos familiares de RTH sin asociación al locus THRβ [36], indicando la posibilidad de una mayor heterogeneidad de esta patología.

En el presente trabajo describimos los estudios clínicos y moleculares de una familia con RTH debido a una sustitución en la posición 453 del aminoácido prolina por treonina, constituyendo ésta la segunda mutación en el gen THRβ, identificada en la población argentina.

Materiales y Métodos

Cuadro clínico-bioquímico

Paciente (Vi.B.) de 16 años de sexo femenino, de origen caucásico, consultó en agosto de 1999 por bajo peso, nerviosismo, palpitaciones e hipersudoración. Como antecedentes familiares se destaca una tía con diagnóstico de hipertiroidismo. Los hallazgos del examen físico fueron: ausencia de oftalmopatía, piel tibia y húmeda, dudoso temblor distal, frecuencia cardíaca 96 por minuto, regular e igual y bocio difuso. El laboratorio tiroideo demostró valores de TSH inadecuadamente normales para valores elevados de hormonas tiroideas totales y libres (Tabla 1). El test de TRH- TSH descartó la inhibición del eje tirotrófico (TSH basal: 1,94 mU/L y post TRH a los 30 minutos: 15,84 mU/L). Los anticuerpos antireceptor de TSH (TRAb) fueron menores al 5% y los anticuerpos antiperoxidasa tiroidea menores a 10 U/L. La curva de

captación tiroidea con I^{131} fue a la 1era h: 10 %; 24 hs: 80 %. El centellograma tiroideo con Tc99 demostró una tiroides de forma conservada y tamaño aumentado con distribución uniforme del trazador, compatible con bocio difuso. La paciente evolucionó estable, con frecuencias cardíacas de 80 por minuto, regular e igual y sin hallazgos clínicos compatibles con hiperfunción tiroidea.

En la hermana mayor (F.B.) de la paciente durante la semana 14 de embarazo se detectó un bocio difuso con una frecuencia cardíaca de 100 por minuto, regular e igual, adecuada a su estado gestacional. No presentaba signos y síntomas de hiper o hipofunción tiroidea. El laboratorio tiroideo muestra valores de T_3 total y T_4 libre elevados y una TSH dentro de los niveles normales (Tabla 1). El parto y el recién nacido fueron normales.

La hermana menor (Ve.B.), su padre y su madre eran eutiroideos, sin bocio. El perfil bioquímico tiroideo de F.B., Ve.B. y del padre mostraba valores elevado de T_3 total y T_4 libre con TSH dentro de los límites normales, compatible con un cuadro de RTH.

Purificación de ADN genómico

Después de obtener el consentimiento informado por escrito, se extrajo de cada uno de los miembros de la familia estudiada muestras de sangre periférica. Esta investigación fue aprobada por el comité de ética local. ADN genómico fue extraído a partir de leucocitos por el método de SDS-proteinasa K.

Secuenciación del ADN

Los exones 9 y 10 del gen THRβ, incluyendo las señales de "splicing" y las regiones flanqueantes intrónicas fueron amplificadas con el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las amplificaciones por PCR fueron realizadas en 100 µl, utilizando un "buffer standard" de PCR (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conteniendo 100 - 300 ng de ADN genómico, 2,5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 4 % de dimetilsulfoxido, 2 U de Taq polymerasa (Invitrogen, Life Technologies) y 50 pmol de cada primer "forward" y "reverse". Primers intrónicos fueron especialmente diseñados para cada uno de los exones 9 y 10 (exón 9: 9F: 5' ctggcattttgaattcgttctttgctg 3', 9R: 5' aaagctctttggatccccactaacgag 3'; exón 10: 10F: 5' ccttccatctctgcagcaatgtccatc 3', 10R: 5' gaattatgagaatgaattcagtcagt 3'). Las muestras fueron desnaturalizadas a 95 °C durante 3 minutos y sometidas luego a 40 ciclos de amplificación. Cada ciclo comprende: desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación del primer a 55 °C durante 30 segundos, y polimerización a 72 °C durante 1 minuto. Luego del último ciclo, las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a 72 °C para asegurar que la etapa final de polimerización esté completa.

	T_3 total ng/dl	T_4 total µg/dl	T_3 libre ng/dl	TSH mU/L	AntiTPO U/L
Vi.B. 1	352	15,9	3,61	0,99	<10
2	293		2,72	1,94	
3	313		3,16	2,96	
F.B.	238		2,70	2,09	<70
Ve.B.	285		2,88	0,98	<70
Padre	236		3,30	0,48	
Madre	116		1,25	0,82	<70
Valores Normales	80-200	4-12	0,7-2,3	0,32-5	<70

Tabla I. Estudios bioquímicos

Los productos amplificados fueron analizados en un gel de agarosa de 2%. La purificación de los fragmentos de PCR para las reacciones de secuenciación, fue realizada con “Concert rapid gel extraction system” (Invitrogen, Life Technologies).

La secuenciación del ADN fue realizada por el método basado en terminadores de cadena, con Taq polimerasa (*f*mol, Promega, Madison, WI) utilizando los mismos primers "forward" y "reverse" usados para la amplificación por PCR.

Los resultados fueron analizados por los programas PC gene (Intelligenetics, Geneva, Switzerland), DNASTAR (DNASTAR Inc, University of California-SF, USA) y Nucleotide BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Análisis por "Single Strand Conformation Polymorphism" (SSCP).

El método de SSCP [37] fue empleado para la identificación de la mutación 1357C>A en el exón 10, con las mismas condiciones de amplificación por PCR descriptas en la secuenciación del ADN, utilizando los mismos primers intrónicos "forward" y "reverse".

El gel para SSCP contiene 10 % de poliacrilamida (29:1) (Invitrogen, Life Technologies) en 1x TBE buffer (1x TBE: 50 mM Tris-borato, 4 mM EDTA, pH 8,3).

5 µl del producto de PCR fueron mezclados con 3 µl del “buffer” de siembra desnaturalizante (98 % formamida, 0,5 % EDTA, 0,05 % azul de bromofenol, y 0,05 % xileno cianol).

Inmediatamente previo a la siembra, las muestras fueron desnaturalizadas a 95 °C durante 3 minutos y rápidamente enfriadas en hielo para estabilizar la cadena simple de ADN. Las muestras fueron corridas en “buffer” 1 x TBE por encima de 18 hs. y a una temperatura constante de 4 °C. Los fragmentos de PCR fueron visualizados por coloración con plata. Los geles fueron tratados durante 6 minutos, dos veces, en 10% de etanol y 0,5 % de ácido acético. Luego fueron sumergidos en una solución de coloración de 0,2 % de $AgNO_3$ con agitación durante 20 minutos. Finalmente fueron revelados en 1,5 % de NaOH y 0,36 % de formaldehído durante 10 minutos.

Resultados

Los resultados del análisis de secuenciación del exón 10 del gen THRβ de cada uno de los miembros de la familia estudiada son mostrados en la Figura 1. Una transversión citosina a adenina heterocigota en la posición nucleotídica 1357 (1357C>A) fue identificada en la paciente propósito Vi.B., en sus dos hermanas, F.B. y Ve.B., y en su padre. Por el contrario, la madre presenta citosina en los dos alelos, indicando el origen paterno de la mutación. La transversión origina una sustitución de prolina en la posición 453 por treonina, cambio del codón CCT por ACT (P453T). La secuenciación del exón 9 en Vi.B. no mostró modificaciones.

Con el fin de validar por otro método la mutación P453T, se realizó un análisis de SSCP del fragmento de PCR correspondiente al exón 10 de la paciente Vi.B. y de 8 controles normales no relacionados. La electroforesis muestra un doble fragmento en Vi.B., correspondiente al alelo normal y al alelo conteniendo la mutación (Figura 2), mientras que en los controles sólo se observa la presencia de alelos normales.

Un error de secuencia se detectó en la posición nucleotídica 1351, donde la previamente publicada citosina (NCBI: NM_000461, secuencia del mRNA del THRβ) corresponde a una timina, esto origina un cambio de la Leucina 451 (CTC) por Fenilalanina (TTC). Recientemente GenBank publicó la secuenciación completa del gen THRβ (NCBI: NT_005564) y en la posición 1351 del exón 10 se indica una T, como en nuestras secuencias.

Discusión

Los pacientes con RTH poseen una elevación de T_3 y T_4 circulantes con ineficaz supresión de la TSH. La administración exógena de hormonas tiroideas no produce el efecto esperado de supresión de la secreción de la TSH pituitaria y no induce la respuesta metabólica de los tejidos periféricos. El diagnóstico de la resistencia a hormonas tiroideas se basa en manifestaciones clínicas, estudios de laboratorio y en el análisis molecular. De acuerdo a los tejidos afectados podemos clasificarla en dos grupos: a) Resistencia generalizada a las hormonas tiroideas

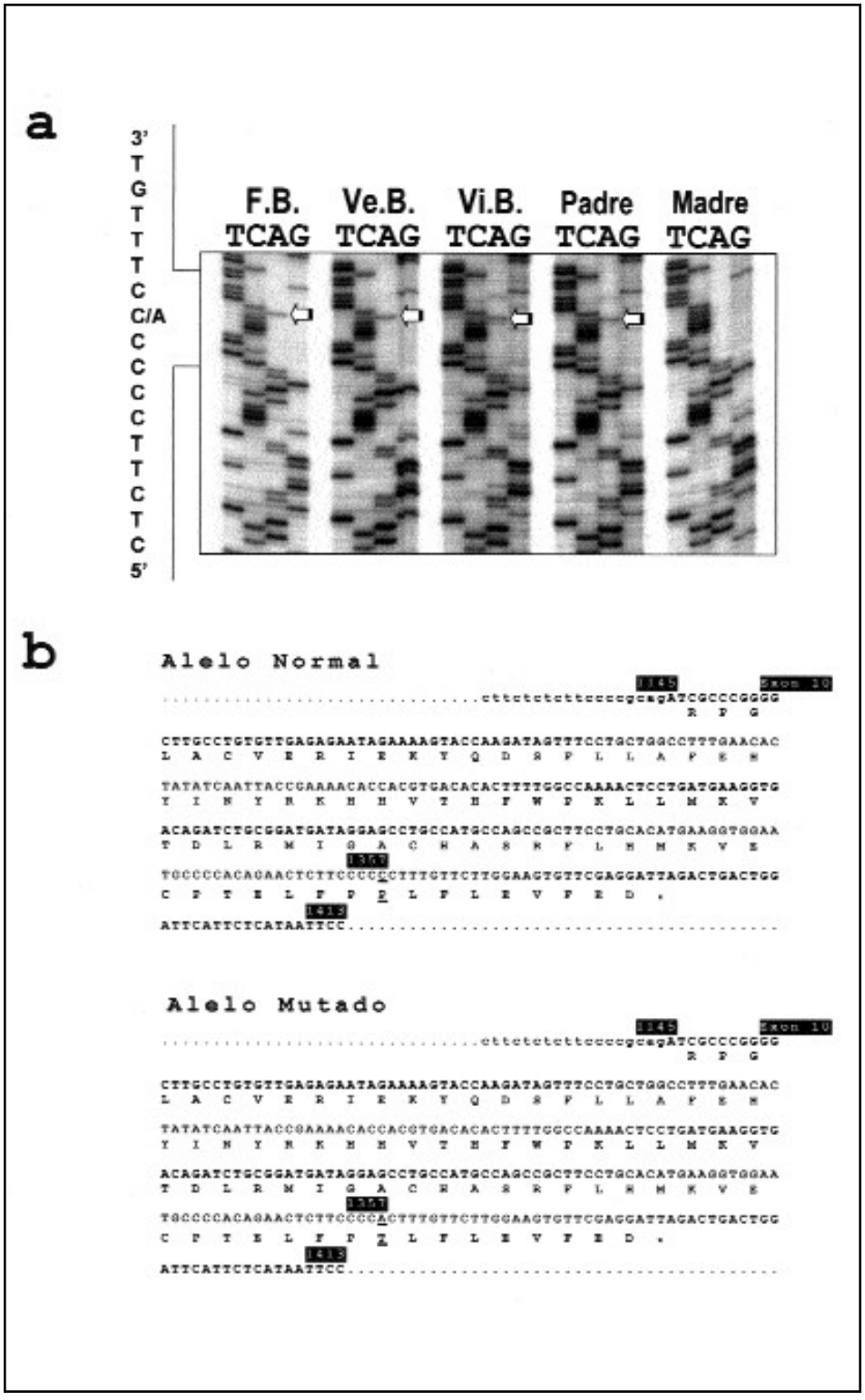


Figura 1. Identificación y análisis de la familia de la mutación heterocigota 1357C>A (P453T) en el exón 10 del gen THR β:

a) Secuencia parcial (cadena codificante) de los fragmentos amplificados por PCR correspondiente al exón 10 a partir del ADN genómico de los miembros de la familia estudiada. La flecha indica la mutación 1357 C>A presente en el paciente propósito Vi.B, en sus dos hermanas, F.B. y Ve.B., y en su padre, el alelo normal coexiste en cada caso con el alelo mutado. La madre presenta sólo la citosina normal en esa posición.

b) Secuencia nucleotídica parcial del exón 10 y sus aminoácidos deducidos, y las sequencias nucleotídicas que corresponden a las uniones intrón 9/exón 10/intrón 10 del gen THRβ normal y mutado. El exón mapea entre las posiciones 1145 y 1413. Las secuencias intrónicas son indicadas en letras minúsculas y las secuencias exónicas en letras mayúsculas. El sitio del codón de terminación es indicado por un asterisco.

La secuencia nucleotídica es mostrada en la línea superior y los aminoácidos (representados por el código de una letra) se observan debajo de sus respectivos codones. La mutación 1357C>A (P453T) está subrayada en el alelo normal y mutado.

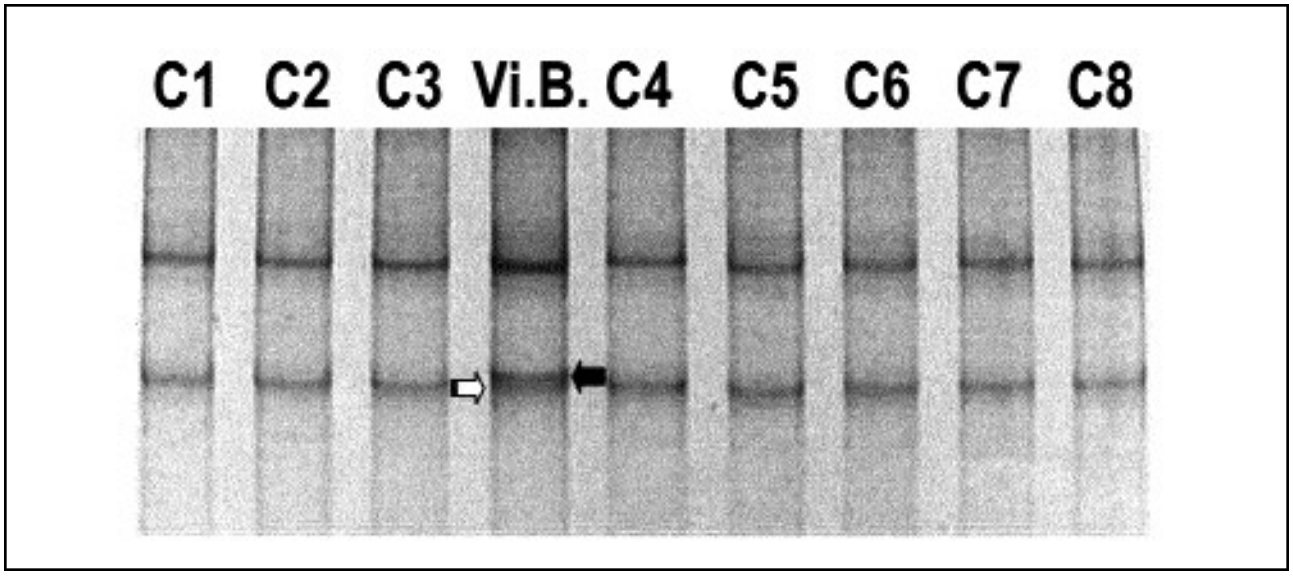


Figura 2. Análisis por Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) de la mutación heterocigota 1357C>A (P453T) en el exón 10 del gen THR β**:** La presencia del alelo mutado 1357C>A (P453T) resulta en un fragmento de diferente movilidad en el gel de poliacrilamida. Los fragmentos de PCR fueron visualizados por coloración con plata. La flecha negra indica el fragmento con la mutación, la flecha blanca el fragmento con movilidad normal.
Vi.B.: paciente propósito; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8: controles.

(GRTH: Generalized Resistance to Thyroid Hormone) y b) Resistencia pituitaria a las hormonas tiroideas (PRTH: Pituitary Resistance to Thyroid Hormone) [5-7].

La paciente propósito (Vi.B.) presentó un cuadro clínico de nerviosismo, palpitaciones e hipersudoración asociado a bocio difuso. A la edad de 16 años se detectaron parámetros alterados de la función tiroidea compatibles con diagnóstico de RTH, y los estudios moleculares identificaron una mutación heterocigota en el gen THRβ. En su padre y sus dos hermanas se identificó la misma mutación. Alrededor de 70 mutaciones fueron caracterizadas en el gen THRβ [15-31]. La mutación causante de RTH en esta familia resulta de la sustitución de la prolina en la posición 453 por treonina (P453T). Mutaciones de la prolina 453 han sido previamente publicadas en otras familias con RTH e incluyen sustituciones por treonina [16,18] o histidina [9,17] o serina [23]. Estos pacientes tienen similar nivel de hormonas tiroideas como las observadas en nuestros pacientes. Las mutaciones causantes de RTH han sido localizadas en tres dominios limitados del THRβ. La P453T está localizada en el dominio 1, en la región LBD del receptor.

El 85 % de los casos publicados con resistencia a hormonas tiroideas corresponden a la forma GRTH, en esta forma la participación de la pituitaria en la hiposensibilidad global a las hormonas tiroideas produce un efecto compensatorio parcial al defecto. Los sujetos no tratados usualmente presentan un cierto estado metabólico compensado a expensas de altos niveles de hormonas tiroideas circulantes mantenidas por la secreción de la TSH en respuesta al TRH hipotalámico. Esta compensación es variable si consideramos los diferentes individuos y tejidos, coexistiendo evidencias clínicas y de laboratorio de exceso y de deficiencia de hormonas tiroideas o de grados variables de resistencia en los tejidos periféricos, al mismo tiempo.

Los criterios para diagnosticar un síndrome de GRTH pueden ser resumidos de la siguiente manera:

a) Un elevado nivel de T_4 sérica junto con niveles de TSH no suprimibles es el mínimo requerimiento para el diagnóstico de GRTH. Los niveles de T_3 sérica están también elevados.
b) Los niveles de TSH en el 85 % de los casos de GRTH están dentro de los niveles normales a pesar del elevado nivel de las hormonas

tiroideas circulantes. La respuesta de la secreción de TSH a la TRH es normal o levemente exagerada.

La confirmación del diagnóstico de GRTH requiere de la demostración de la sensibilidad reducida de los tejidos a las hormonas tiroideas exógenas. En el 90 % de los casos observamos una incompleta supresión de los niveles basales de TSH por administración de T_3 exógena. No existen síntomas y signos patognomónicos de la GRTH, por el contrario lo más típico es la presentación heterogénea, en la cual el elevado nivel de hormonas tiroideas compensa la resistencia hormonal y los individuos son eutiroideos. Algunos individuos con RTH pueden aparecer francamente hipotiroideos, mientras que otros presentan sintomatología de tirotoxicosis. El mismo sujeto con RTH puede exhibir síntomas y signos de hipotiroidismo en algunos tejidos, mientras que en otros tejidos presentan signos sugestivos de tirotoxicosis. El más frecuente signo en la GRTH es el bocio por acción de la TSH. El agrandamiento tiroideo es difuso, con variable tamaño; puede existir desde mínimos agrandamientos hasta grandes bocios. La familia estudiada en el presente trabajo presenta características clínicas y bioquímicas de GRTH.

El síndrome de PRTH difiere del GRTH por las manifestaciones del hipermetabolismo por exceso de hormonas tiroideas a nivel de los tejidos periféricos, al no existir resistencia periférica. Al igual que en el GRTH no existe supresión de la concentración sérica basal de TSH a pesar del elevado nivel de las hormonas tiroideas, la secreción hipofisaria de la TSH sigue respondiendo a la acción de la TRH. Los individuos con PRTH presentan bocio e hipertiroidismo. El porcentaje del total de individuos afectados por resistencia a hormonas tiroideas que presentan PRTH es del 15 %. Mutaciones en el THRβ han sido identificadas en individuos clasificados como PRTH [24,38].

En conclusión, en el presente trabajo hemos caracterizado una familia con RTH causada por una sustitución P453T en el dominio 1 de la región LDB del gen THRβ.

Agradecimientos

C. M. Rivolta es Becaria del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET).

H. M. Targovnik es Miembro de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico del CONICET.

Este trabajo fue realizado por los aportes de los siguientes subsidios: Universidad de Buenos Aires (B 087/2001), CONICET (0853/98) y FONCYT (05-08838/ PICT 2000/2001).

Bibliografía

1. Refetoff, S.; De Wind, L.T.; De Groot, L.J. Familial syndrome combining deaf-mutism, stippled epiphyses, goiter, and abnormally high PBI: possible target organ refractoriness to thyroid hormone. J Clin Endocrinol Metab 27: 279-294, 1967.
2. Refetoff, S.; De Groot, L.J.; Benard, B. y col. Studies of a sibship with apparent hereditary resistance to the intracellular action of thyroid hormone. Metabolism 21: 723-756, 1972.
3. Lamberg, B.A. Congenital euthyroid goitre and partial peripheral resistance to thyroid hormones. Lancet 1:854-857, 1973.
4. Refetoff, S. Syndromes of thyroid hormone resistance. Am J Physiol 243: 88-98, 1982.
5. Refetoff, S.; Weiss, R. E.; Usala, S. J. The Syndromes of Resistance to thyroid hormone. Endocr Rev 14: 348 - 399, 1993.
6. Chatterjee, V. K. K. Aetiology and pathogenesis of thyroid hormone resistance. Topical Endocrinology 4: 2 - 5, 1996.
7. Weiss, R.E.; Refetoff, S. Resistence to thyroid hormone. Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders 1: 97-108, 2000.
8. Beck-Peccoz, P.; Chatterjee, V.K.K. The variable clinical phenotype in thyroid hormone resistance syndrome. Thyroid 4: 225-232, 1994.
9. Usala, S. J.; Tennyson, G. E.; Bale, A. E. y col. A base mutation of the C-erbA-beta thyroid hormone receptor in a kindred with generalized thyroid hormone resistance: molecular hetero-

geneity in two other kindreds. J Clin Invest 85: 93-100,1990.
10. Sap, J.; Munoz, A.; Damm, K. y col. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. Nature: 324: 635 - 640, 1986.
11. Weinberger, C.; Thompson, C. C.; Ong, E. S. y col. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. Nature 324: 641 - 646, 1986.
12. Sakurai, A.; Nakai, A.; DeGroot, L. J. Structural analysis of human thyroid receptor β gene. Mol Cel Endocrinol 71: 83 - 91, 1990.
13. Usala, S.J.; Bale, A.E.; Gesundheit, N. y col. Tight linkage between the syndrome of generalized thyroid hormone resistance and the human c-erb Aβ gene. Mol Endocrinol 2: 1217-1220, 1988.
14. Beck-Peccoz, P.; Chatterjee, V. K. K.; Chin, W. W. y col. Nomenclature of thyroid hormone receptor β- gene mutations in resistance to thyroid hormone: Consensus statement from the first workshop on thyroid hormone resistance. J Clin Endocrinol Metab 78: 990 - 993, 1994.
15. Sakurai, A.; Takeda, K.; Ain, K. y col. Generalized resistance to thyroid hormone associated with a mutation in the ligand-binding domain of the human thyroid hormone receptor β. Proc Natl acad Sci (USA) 86: 8977-8981, 1989.
16. Parilla, R.; Mixson, A. J.; McPherson, J. A. y col. Characterization of seven novel mutations of c-erb Aβ gene in unrelated kindreds with generalized thyroid hormone resistance. Evidance for two "hot spot" regions of the ligand binding domain. J Clin Invest 88: 2123 - 2130, 1991.
17. Takeda, K.; Balzano, S.; Sakurai, A. y col. Screening of nineteen unrelated families with generalized resistance to thyroid hormone for known point mutations in the thyroid hormone receptor β gene and the detection of a new mutation. J Clin Invest 87: 496 - 502, 1991.
18. Shuto, Y.; Wakabayashi, I.; Amuro, N. y col. A point mutation of the 3,5,3-prime-triiodothyronine-binding domain of thyroid hormone receptor-beta associated with a family with generalized resistance to thyroid hormone. J Clin Endocr Metab 75: 213-217,1992.
19. Takeda, K.; Sakurai, A.; De Groot, L.J. y col. Recessive inheritance of thyroid hormone resistance caused by complete deletion of the protein- coding region of the thyroid hormone receptor-β gene. J Clin Endocrinol Metab 74: 49-55, 1992.
20. Weiss, R. E.; Weinberg, M.; Refetoff, S. Identical mutations in unrelated families with generalized resistance to thyroid hormone occur in cytosine-guanine-rich areas of the thyroid hormone receptor beta gene: Analysis of 15 families. J Clin Invest 91: 2408 - 2415, 1993.
21. Bartolone, L.; Regalbuto, C.; Benvenga, S. y col. Three new mutations of thyroid hormone receptor-β associated with resistance to thyroid hormone. J Clin Endocrinol Metab 78: 323 - 326, 1994.
22. Weiss, R.E.; Stein, M.A.; Duck, S.C. y col. Low intelligence but not attention deficit hyperactivity disorder is associated with resistance to thyroid hormone caused by mutation R316H in the thyroid hormone receptor β gene. J Clin Endocrinol Metab 78: 1525-1528, 1994.
23. Refetof f, S.; Weiss, R.E.; Wing, J.R. y col. Resistance to thyroid hormone in subjects from two unrelated families is associated with a point mutation in the thyroid hormone receptor β gene resulting in the replacement of the normal proline 453 with serine Thyroid 4: 249-254, 1994.
24. Adams, M.; Mattehews, C.; Collingwood, T .N. y col. Genetic analysis of 29 kindreds with generalized and pituitary resistance to thyroid hormone: identification of thirteen novel mutations in the thyroid hormone receptor β gene J Clin Invest 94: 506-515, 1994.
25. Weiss, R. E.; Chyna, B.; Duell, P. B. y col. A new point mutation (C446R) in the thyroid hormone receptor-beta gene of a family with resistance to thyroid hormone. J Clin Endocr Metab 78: 1253-1256, 1994.
26. Weiss, R. E.; Tunca, H.; Gerstein, H. C. y col. A new muation in the thyroid hormone receptor (TR) beta gene (V458A) in a family with resistance to thyroid hormone (RTH). Thyroid 6: 311-312, 1996.
27. Pohlenz, J.; Schonberger, W.; Wemme, H. y col. New point mutation (R243W) in the hormone binding domain of the c-erbA beta-1 gene in a family with generalized resistance to thyroid hormone. Hum Mutat 7: 79-81, 1996.
28. Yagi, H.; Pohlenz, J.; Hayashi, Y. y col. Resistance to thyroid hormone caused by two

mutant thyroid hormone receptor β, R243Q and R243W, with marked impairment of function that cannot be explained by altered in vitro 3,5,3'-triiodothyronine binding affinity. J Clin Endocrinol Metab 82: 1808-1614, 1997.
29. Di Fulvio, M.; Chiesa, A. E.; Baranzini, S. E. y col. A New Point Mutation (M313T) in the Thyroid hormone Receptor β Gene in a Patient with Resistance to Thyroid Hormone. Thyroid 7: 43 - 44, 1997.
30. Nagashima, T.; Yagi, H.; Nagashima, K. y col. A novel point mutation of thyroid hormone receptor β gene in a family with familial resistance to thyroid hormone. Thyroid 7: 771-773, 1997.
31. Furlanetto, T.W.; Kopp, P.; Peccin, S. y col. A novel mutation (M310L) in the thyroid hormone receptor β causing resistence to thyroid hormone in a Brazilian kindred and a neonate. Mol Genet Metab 71: 520-526, 2000.
32. Sakurai, A.; Miyamoto, T.; Refetoff, S. y col. Dominant negative transcriptional regulation by a mutant thyroid hormone receptor β in a family with generalized resistance to thyroid hormone. Mol Endocrinol 4: 1988-1944, 1990.
33. Nagaya, T.; Eber hardt, N.L.; Jameson, J.L. Thyroid hormone resistance syndrome: correlation of dominant negative activity and location of mutations. J Clin Endocrinol Metab 77: 982-990, 1993.
34. Yoh, S.M.; Chatterjee, V.K.K.; Privalsky, M.L. Thyroid hormone resistance syndrome manifiests as an aberrant interaction between mutant T3 receptor and transcriptional corepressor. Mol Endocrinol 11: 470-480, 1997.
35. Tagami, T.; Gu, W-X.; West, B. y col. A novel natural mutation in TRβ that has strong interaction with nuclear corepressors and impaired interaction with coactivators. Mol Endocrinol 12: 1888-1902, 1998.
36. Pohlenz, J.; Weiss, R.E.; Macchia, P.E. y col. Five new families with resistance to thyroid hormone not caused by mutations in the thyroid hormone receptor beta gene. J Clin Endocrinol Metab 84: 3919-3928, 1999.
37. Boothroyd, C. V.; Teh, B. T.; Hayward, N. K. y col. Single base mutation in the hormone binding domain of the thyroid hormone receptor beta gene in generalized thyroid hormone resistance demonstrated by single stranded conformation polymorphism analysis. Biochem Biophys Res Commun 178: 606-612, 1991.
38. Safer, J. D.; O'Connor, M. G.; Colan, S. D. y col. The thyroid hormone receptor-beta gene mutation R383H is associated with isolated central resistance to thyroid hormone. J Clin Endocr Metab 84: 3099-3109,1999.

"Siempre es más valioso tener el respeto, que la admiración de las personas".

JEAN JACQUES ROUSSEAU

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol 40 • No. 1
Copyright © 2003 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo

REVISIÓN

Fisiología tiroidea y embarazo. Aspectos maternos, placentarios y fetales.

Abalovich, M.S.

Médico de la División Endocrinología del Hospital Durand. Docente autorizado de Medicina Interna de la UBA.
Sub Director de la Carrera de Especialistas en Endocrinología. Unidad Académica Durand. Facultad de Medicina. UBA.

Resumen

Durante el embarazo, la tiroides materna necesita incrementar su producción de T4; ello ocurre, por un lado, por una reducción transitoria en los niveles de T4 libre (T4L) debido al precoz aumento de la globulina que transporta tiroxina (TBG), a la pérdida de T4 por su pasaje y degradación placentaria, como así también a la menor diponibilidad de yoduro para la síntesis debido al aumento del filtrado glomerular del mismo. Por otro lado, existe una acción tiroestimulante de origen placentario por parte de la gonadotrofina coriónica (HCG) que "obliga" a la tiroides a aumentar su producción de T4 para compensar la pérdida mencionada. Es necesario, entonces, que la glándula se adapte a un equilibrio nuevo durante el embarazo, el cual suele alcanzarse sin dificultad en áreas iodo suficientes; sin embargo, esto no ocurre cuando la producción hormonal se halla limitada tal como se observa en áreas con deficiencia de iodo moderada o severa.

Niveles maternos adecuados de T4 en la primera mitad de embarazo son de gran importancia debido a que, por transferencia placentaria, contribuyen al desarrollo temprano del SNCfetal cuando el feto no puede sintetizar sus propias hormonas o lo hace escasamente. Al respecto, se ha demostrado la presencia de pequeñas concentraciones de T4 en el líquido celómico tan temprano como a las 6 semanas de gestación. Receptores nucleares a T3 pueden identificarse en cerebro a las 10 semanas de gesta y se incrementan seis veces hacia la semana 12, antes del desarrollo de la función tiroidea fetal.

La fisiología tiroidea del feto a lo largo de la gesta presenta características peculiares para favorecer procesos anabólicos y evitar una excesiva catabolia proteica. Niveles hormonales medidos en líquido amniótico y/o en cordón umbilical pueden ser útiles para evaluar función tiroidea fetal en aquellas circunstancias en que se sospeche una alteración en la misma y permiten iniciar un tratamiento "in utero" en caso de ser necesario.

Abstract

During pregnancy, the maternal thyroid is forced to increase thyroxine (T4) production. This is due to a temporary reduction in free T4 levels because of the precocious increment of globulin binding thyroxine (TBG),

Dirección postal: Dr. Marcos Abalovich. División Endocrinología, Hospital Carlos Durand, Díaz Vélez 5044 (1405) Buenos Aires, Argentina. Tel (5411) 4982-5212- Fax (5411) 4958-4377, e-mail: mabalovich@intramed.net.ar
Palabras Clave: embarazo, hormonas tiroideas, tiroides materna, transferencia placentaria, función tiroidea fetal.
Key words: Pregnancy, Thyroid Hormones, Placental Transfer, Fetus Thyroid Function.

to the loss of T4 across the placent, as well as a lower disponibility of iodide for the synthesis bound to the increment of glomerular filtrate. On the other hand, there is a thyroid stimulating action due to the human chorionic gonadotropin (HCG) secretion of placental origin. The HCG forces the thyroid to increase its T4 production to compensate said loss. Then, the thyroid must adapt itself to a new balance during pregnancy, which is usually reached without difficulties in iodine-sufficient-areas. Howewer, this does not take place when hormone production is limited, as it can be observed in areas wiyh mild to severe iodine defficiency.

Thyroxine adequate maternal levels during the first half of pregnancy are of great relevance for, by means of placental transfer, they contribute to the early development of fetus Central Nervous System when the fetus is unable to synthetize his own hormones or this synthesis is poor.

Related to this, the presence of low T4 concentration in celomic fluid as early as six week gestation has been proved. T3 nuclear receptors can be identified in brain at 10 week gestation and they increase six fold towards the end of the first trimester, when fetal thyroid function has not yet developed.

The fetus thyroid physiology during gestation, shows peculiar characteristics to favour anabolic processes and to avoid an excessive proteic catabolism. Hormone levels measured in amniotic fluid and/or umbilical cord migth be useful to asses the fetus thyroid function in those cases when an alteration of same is suspected and to initiate an “in uterus” treatment if necessary.

Introducción

Desde hace más de 30 años [1] se conoce que el eje hipotalamo-hipófiso-tiroideo presenta modificaciones en mujeres normales durante el embarazo. Si bien la fisiología tiroidea materna y fetal son diferentes, ambos sistemas interactúan a través de la placenta y del líquido amniótico, lo cual permite la transferencia de iodo y de hormona tiroidea de la madre al feto. Hoy conocemos que el pasaje trasplacentario de tiroxina (T4) particularmente durante el primer trimestre de embarazo adquiere importancia para el desarrollo neurológico fetal [2,3] y el adecuado coeficiente de inteligencia (IQ) en los niños, especialmente en áreas iodo deficientes [4,5] aunque también se ha descripto su relevancia en zonas con adecuado aporte iodado. [6]

A) Aspectos Maternos

Durante el embarazo, la tiroides materna necesita incrementar su producción de T4; ello se debe, por un lado, a una reducción transitoria en los niveles de T4 libre (T4L) debido al precoz aumento en los niveles de la globulina que transporta tiroxina (TBG), a la pérdida de T4 por su pasaje y degradación placentaria, como así también a la menor diponibilidad de yoduro para la síntesis debido al aumento del filtrado glomerular del mismo. Por otro lado, existe una acción tiroestimulante de origen placentario de parte de la gonadotrofina coriónica (HCG) que “obliga” a la tiroides a aumentar su producción de T4 para compensar la pérdida mencionada. Es necesario, entonces, que la glándula se adapte a un equilibrio nuevo durante el embarazo, el cual suele alcanzar sin dificultad en áreas iodo suficientes; sin embargo, esto no ocurre cuando la producción hormonal se halla limitada tal como se observa en áreas con deficiencia de iodo moderada o severa.

A1) Hormonas tiroideas y proteínas de transporte

Los altos niveles de estrógenos durante el embarazo inducen un aumento en la concentración sérica de la TBG, lo cual se debe a una mayor síntesis hepática y a una menor degradación periférica producto de cambios en su contenido en ácido siálico [7]. Los niveles de TBG en mujeres no embarazadas oscilan entre 11 y 21 µg%. Los mismos comienzan a elevarse tempranamente, a partir del día 20 de gesta, alcanzan un máximo entre las semanas 20ª a 24ª, manteniendo luego una meseta hasta el fin del embarazo, retornando a sus niveles normales al cabo de 6 semanas posparto. Otra proteína de transporte, la prealbúmina, por la que la T4 tiene menos afinidad, sólo se

incrementa levemente o no se modifica, mientras que la albúmina puede incluso descender relativamente como consecuencia del aumento de la volemia, característico del embarazo [8].

El incremento en los niveles de TBG trae aparejado el ascenso consiguiente en los niveles de hormonas tiroideas totales, fundamentalmente T4 y, en menor medida T3, dado que la afinidad de la proteína de transporte es 100 veces mayor por T4 que por T3. La curva de T4 a lo largo de la gesta es semejante a la de TBG, alcanzándose valores discretamente superiores a los de mujeres no grávidas. Lo dicho explica que las hormonas totales no sean de utilidad para el diagnóstico de hipertiroidismo durante el embarazo.

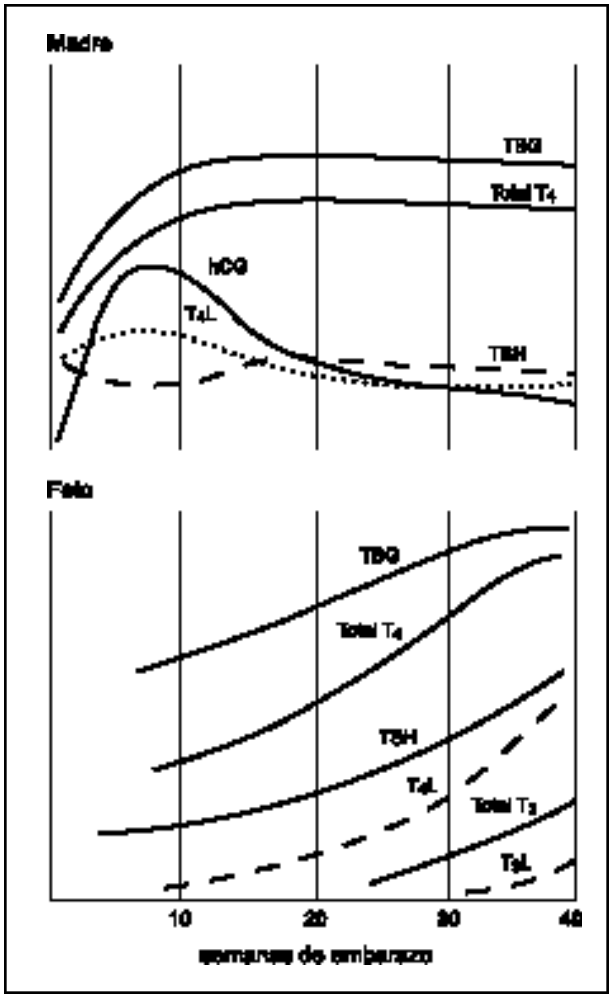


Figura 1. Cambios en la función tiroidea materna y fetal durante el embarazo. Burrow, GN. y col. [14]

Una situación diferente puede advertirse en áreas con deficiencia en iodo. Glinoer y col. [9] estudiaron 606 mujeres embarazadas normales de Bélgica, un país con moderado iodo deficiencia (ioduria media 50 µg día) y observaron que la saturación de TBG por T4 (porcentaje de los sitios de unión de TBG ocupados por T4 estimados a través de la relación molar T4/TBG) descendía un 40% en el 1er. trimestre y un 28% en la semana 20ª; 1/3 de las pacientes presentaban hipotiroxinemia relativa y aumento de la relación T3/T4 presumiblemente por secreción preferencial de T3.

Respecto a los niveles de hormonas libres durante el embarazo, han existido ciertas controversias en los últimos años producto de las diversas metodologías empleadas, habiéndose descripto niveles normales [10], descendidos [11] o incrementados [12] a lo largo de la gesta. Sin embargo, hoy se admite que los niveles de T4L y T3L alcanzan sus picos más altos durante el 1er. trimestre, particularmente entre la 8ª y 12ª semana, sin superar, por lo general, el límite superior de lo normal y luego descienden a lo largo de la gesta entre 15 y 35% cuando se compara el último trimestre en relación a controles tempranos [13]. Los incrementos mencionados en las hormonas libres en el 1er. trimestre parecen vincularse a la acción de estimulantes tiroideos placentarios tal como analizaremos más abajo.

Los cambios en los niveles de TBG, T4 total y libre se muestran en la figura 1 [14].

A2) Estimulantes tiroideos maternos

Se han identificado al menos tres estimulantes tiroideos durante el embarazo: uno hipofisario, la tirotrofina (TSH) y otros dos de origen placentario: la HCG y la tirotrofina coriónica (HCT).

Los datos iniciales concernientes a los niveles de TSH durante el embarazo han sido controvertidos: algunos autores no encontraron cambios [15], y otros hallaron un incremento variable a lo largo del mismo [16], aún en mujeres sin iodo deficiencia [17]. Sin embargo, la introducción hace algunos años de los ensayos ultrasensibles de TSH permitió gran pre-

cisión en las determinaciones de esta hormona y definir más claramente sus cambios a lo largo de la gesta. En base a ello hoy se admite que luego de un pequeño ascenso inicial producto del aumento de TBG y el transitorio descenso en la T4L, la TSH sufre una caída hacia fin del primer trimestre pudiendo llegar a niveles no detectables en un 13% a 15% de los casos [8] y luego suele ascender progresivamente durante la segunda mitad. Aunque dentro de límites normales, la diferencia en los niveles de TSH entre el 1er. y 3er. trimestre se hace especialmente notable en áreas iodo deficientes [18].

Respecto de la HCG, su rol como estimulante tiroideo fue postulado hace ya varios años al observarse similitudes estructurales con la TSH y que pacientes portadoras de mola hidatidiforme o coriocarcinoma con muy altos niveles de HCG circulante, eran capaces de presentar hipertiroidismo el cual se resolvía con el tratamiento de la enfermedad de base [19]. Hoy se conoce que, no sólo existe similitud en la estructura de ambas hormonas habida cuenta que son glicoproteínas con subunidad α común y subunidad β de alta homología, sino que también existe una considerable homología entre los receptores de TSH y LH/HCG. Estos receptores de membrana acoplados a la proteína G, comparten el 70% de los dominios transmembrana y el 45% de los dominios extracelulares, donde existen los sitios de unión a las hormonas [20]. Esto explica que "in vitro" la HCG haya tenido un efecto estimulante directo sobre cultivos de células tiroideas. De todos modos, debe entenderse que la potencia tiroestimulante de la HCG es mucho menor que la de TSH estimándose que 1mUI/L de TSH equivale a 40000 UI/L de HCG [21].

Durante el embarazo normal la HCG presenta dos picos de secreción: uno entre la 8ª y 18ª semana y otro, más tardío, entre la 32 y 39 semanas. Se ha observado una correlación positiva entre el primer pico de HCG y los niveles de T4 libre y T3 libre [22] y, en cambio, una correlación negativa entre HCG y TSH (figura 1). En base a esto puede postularse que el pico de HCG origina un aumento en la producción de hormonas tiroideas durante el 1er. trimestre con T4 libre en el límite superior, la cual por retroalimentación negativa sobre la Unidad Hipotálamo Hipofisaria determina la caída transitoria en los niveles de TSH. Esto adquiere sustento en la observación de que la abrupta caída de HCG en mujeres que abortan en forma terapéutica en el primer trimestre origina una caída de hasta 15% en los niveles hormonales mientras que la TSH se duplica.

Respecto a la HCT, es una glicoproteína de peso molecular 28000, sólo fue detectada en un 35% de los embarazos normales y con niveles, en general muy bajos [23]. Por ello se considera que la HCT no influye en el control de la función tiroidea durante el embarazo.

A3) Tiroglobulina (Tg)

Diversos trabajos han coincidido en demostrar que los niveles de tiroglobulina aumentan durante el embarazo [9], especialmente durante el último trimestre. Si bien ello se atribuyó primero al aumento de HCG, esto no explicaría que el mayor incremento de tiroglobulina suceda en la última parte del embarazo.

Estudios más recientes han revelado que la elevación de tiroglobulina estaría vinculada con otros índices de estimulación tiroidea tales como leve incremento de TSH y de la relación T3/T4 a lo largo de la gesta sugiriendo secreción preferencial de T3 tal como se observa en áreas iodo deficientes. Más aún, cambios en Tg están asociados con aumentos en el volumen tiroideo y se considera que la Tg podría constituir un marcador bioquímico para monitorear la bociogénesis vinculada al déficit de iodo [24].

A4) Volumen tiroideo

Estudios efectuados sobre necropsias de mujeres fallecidas durante el embarazo, demostraron una pequeña hiperplasia tiroidea en la mayor parte de las mismas [23].

Mientras que en EE.UU. la bociogénesis durante el embarazo ha sido poco descripta, en Europa, en cambio, está mejor documentada. Los incrementos en el volumen tiroideo parecen vincularse a la ingesta de iodo. Así, en Finlandia e Irlanda donde la disponibilidad de iodo se considera adecuada, el aumento de volumen tiroideo osciló entre 10-15%, a diferencia de Bélgica y Dinamarca, por ejemplo, con baja ingesta iodada, en donde el aumento observado fue promedio de un 25%. El bocio revir-

tió parcialmente cuando se evaluó a 12 meses posparto [18].

Una adecuada suplementación de iodo puede prevenir el bocio gestacional en áreas iodo deficiente, siendo aún motivo de debate la cantidad diaria de iodo para tal fin.

B) Transferencia Placentaria

La influencia que las hormonas y otras sustancias que circulan por la sangre materna pueden ejercer sobre el feto depende del grado de permisibilidad de la placenta al pasaje de las mismas.

Así se considera que el iodo, la TRH, las TSI (inmunoglobulinas estimulantes tiroideas) atraviesan la placenta libremente, mientras que la misma es impermeable a la TSH. Datos más controvertidos corresponden al pasaje trasplacentario de hormonas tiroideas.

Antiguos estudios en animales mostraron la dificultad del pasaje de T4, T3 y T3R (T3 reversa); sin embargo, a partir de la década del 90, otros trabajos realizados en embriones de pollo, demostraron que podía existir pasaje de hormonas tiroideas aún en etapas tempranas de la gestación [25]. Asimismo pudieron identificarse receptores a T3 en el cerebro de rata en dichas etapas [26].

Antes de hacer referencia a los estudios en humanos, es necesario recordar que las hormonas tiroideas sufren cambios metabólicos a nivel de la placenta. Tres enzimas catalizan la deiodinación de las iodotironinas en tejidos humanos. La tipo I que cataliza la deiodinación del anillo externo e interno de la T4 es la encargada de convertir T4 a T3, de metabolizar T3 reversa y de poder actuar sobre T4 sulfato y T3 sulfato. Esta enzima se expresa especialmente en hígado, riñón y tiroides pero no en placenta. Las deiodinasas placentarias son la tipo II y III. La tipo II actúa sobre sobre el anillo externo de la T4, su actividad placentaria es alta en las membranas coriales y deciduales, expresándose también en cerebro, hipófisis, grasa parda y queratinocitos. La tipo III predomina en trofoblastos, hallándose también en cerebro y epidermis [14]. La combinación de la actividad de las deiodinasas tipo II y III en placenta producen la conversión de T4 a T3 y de T4 y T3 a T3R y T2 respectivamente.

Como en otros tejidos la actividad de la deiodinasa tipo II se incrementa cuando la disponibilidad de T4 decrece. Esto sugiere que la actividad de deiodinasa tipo II representa un mecanismo homeostático para mantener una adecuada producción de T3 en la placenta cuando los niveles maternos de T4 estén reducidos.

En cambio, la principal función placentaria de la tipo III sería la de mantener una T3 baja para el feto, evitando así un exceso catabólico.

Los primeros estudios de transferencia placentaria en humanos coincidían en señalar el muy escaso pasaje de hormonas tiroideas aún en mujeres con embarazos a término que recibían grandes cantidades de T4 [27]. En aquellos años se consideraba que la T3 podía atravesar la placenta algo mejor que la T4, pero los estudios tenían limitaciones técnicas.

En años posteriores, Vulsma y col. [28] estudiaron 25 recién nacidos con hipotiroidismo congénito debido a un defecto completo de organificación hormonal para evaluar si existía transferencia materna de T4. A pesar de no poder sintetizar hormonas tiroideas, los niños nacieron con niveles bajos de T4 pero dosables (rango de 35 a 75 nmol/L vs valores normales entre 80 y 170 nmol/L), los cuales no podían provenir sino de la sangre materna. Este estudio indica que, por lo menos al final del embarazo, existe pasaje trasplacentario de T4. Otros estudios que midieron T4 en cordón o 1 semana después del parto en neonatos atireóticos, encontraron niveles mucho más bajos de T4 en relación a los hallados por Vulsma, sugiriendo una menor contribución materna en estos casos [4].

Respecto a lo que sucede en el primer trimestre, se ha demostrado la presencia de pequeñas concentraciones de T4 en el líquido celómico ya a las 6 semanas de gestación [2]. Receptores nucleares a T3 pueden identificarse en cerebro a las 10 semanas de gesta y se incrementan seis veces hacia la semana 12, antes del desarrollo de la función tiroidea fetal [29]. Estas observaciones sugieren que también existe transferencia placentaria de T4 en etapas tempranas del embarazo y que la misma puede ser importante para el desarrollo de estructuras cerebrales del feto, cuando éste no puede aún sintetizar de manera efectiva su propia T4 [30]. Un dramático ejemplo de ello lo da el trabajo de De

Zegher y col. [31] quien describió un hipotiroidismo secundario por déficit de PIT 1 en la madre y su bebé. El niño nació con severísimo daño neurológico, irreversible a pesar de instalarse el tratamiento posnatal precoz con hormona tiroidea. A diferencia de los niños observados por Vulsma, este bebé había carecido del aporte de T4 materna a lo largo de buena parte del embarazo.

Asimismo, el 19% de hijos de mujeres hipotiroideas leves no sustituídas tuvieron IQ de 85 o menos a los 7 años de vida [5] y mujeres eutiroideas con T4 libre por debajo del percentilo 10 hacia la semana 12 de gesta dieron a luz niños con disminución en su coficiente de inteligencia, evaluados a los diez meses de vida [6].

Los ejemplos antedichos avalan la importancia de la transferencia de T4 de la madre al feto.

Ya he mencionado que la TSH no atraviesa la placenta, pero sí lo hace, en cambio, la TRH que, cuando fue inyectada a mujeres embarazadas hacia la semana 25 de gestación, produjo un significativo incremento en la TSH del feto [32]. Sin embargo, la TRH materna no parece tener un rol en la regulación del eje hipotalamo-hipófiso-tiroideo fetal. Desde el punto de vista farmacológico, la TRH ha sido utilizada en prematuros para acelerar la maduración pulmonar fetal, un efecto bien conocido de las hormonas tiroideas [33].

Respecto del iodo, éste puede ser concentrado en la tiroides fetal hacia la semana 10 de gestación. Pasa libremente a través de la placenta de tal modo que si es administrado en grandes cantidades o por tiempos prolongados a la madre, puede inducir hipotiroidismo fetal y bocio [34].

C) Función Tiroidea Fetal

C1) Embriogénesis

A partir de su origen en línea media como una saliencia del piso de la faringe anterior, visible hacia el 16-17 día de gestación, la tiroides migra caudalmente permaneciendo unida al piso faríngeo a través del conducto tirogloso. Alcanza su posición final hacia la 7ª semana de gesta. Los folículos tiroideos pasan por tres estadios de desarrollo: el precoloidal (semana 7ª-13ª), el coloidal (semana 13ª-14ª) y el folicular (a partir de la semana 14ª). La tiroglobulina, que provee la matriz para la síntesis de hormonas tiroideas, es detectada tan temprano como a las 5 semanas de gestación. La captación de iodo se detecta hacia la semana 10ª y la producción de T4 se inicia aproximadamente 2 semanas más tarde [4].

C2) Maduración hipotalámica y eje hipotalamo-hipófiso tiroideo

La maduración hipotalámica y el desarrollo del sistema portal hipotálamo-hipofisario comienza en la semana 8ª-9ª y se va complejizando a lo largo de la gesta. El núcleo supraóptico es uno de los primeros en identificarse. La TRH se detecta también hacia la 8ª-9ª semana y su contenido se incrementa en forma progresiva. La TSH, por su parte, se detecta en hipófisis hacia la 10ª semana; el mecanismo de retrocontrol negativo de la T4 sobre la TSH recién se irá desarrollando durante la ultima mitad de la gestación y los primeros 2 meses de vida extrauterina [8].

C3) Concentración de TSH y de hormonas tiroideas durante la vida fetal

La cordocentesis ha contribuido de una manera importante al conocimiento de las concentraciones de TSH y de hormonas tiroideas a lo largo de la vida fetal.

A partir de la semana 12ª en que la tiroides fetal comienza a producir T4, los niveles de esta hormona se incrementan en forma progresiva de tal manera que, de presentar aproximadamente 2µg/dl hacia la semana 12ª, sus niveles ascienden hasta 10µg/dl cerca del momento del parto. El incremento en la T4 total es debido por un lado al incremento de la TBG fetal y por otro, a la producción fetal de T4. El aumento de la TBG refleja la maduración del hígado fetal a la estimulación estrogénica.

Pero no es sólo la T4 total la que asciende sino también la T4 libre, de 0.1 ng/dl en la semana 12ª a 1.5ng/dl a témino. Esto se debe al incremento progresivo en los niveles de TSH (de 4 a 8mU/L entre

la semana 12ª y el término) causado a su vez por la mayor estimulación hipofisaria ejercida por la TRH hipotalámica.

Los niveles de T3 son bajos antes de la semana 30ª (<15 ng/dL) pero luego aumentan hasta cerca de 50 ng/dL próximo al parto. El mantenimiento de una T3 baja se explica por la mayor conversión placentaria de T4 a T3 reversa debido a la deiodinasa tipo III y el ascenso final de la T3 a la actividad de la deiodinasa tipo I fetal [14]. Los cambios en las hormonas tiroideas durante la vida fetal son mostrados en la figura 1 [14].

C4) Metabolismo de las iodotironinas

La ontogenia de las tres deiodinasas que catalizan la deiodinación de T4 difiere a lo largo del desarrollo fetal. Las tipo II y tipo III actúan desde aproximadamente la mitad de la gestación mientras que la tipo I se activa más tardíamente, dando origen, como ya se ha comentado, al ascenso pretérmino de la T3 fetal.

El hecho que la deiodasa tipo I tenga una baja actividad durante buena parte del embarazo explica también la acumulación de metabolitos sulfatados (T4 sulfato, T3 sulfato y T3R sulfato) en el suero fetal, ya que dichos metabolitos son sustrato de la tipo I y no de las otras deiodasas. Se ha postulado que la medición en suero materno de una sustancia similar a T2 sulfato (compuesto W) podría servir como información indirecta de la función tiroidea fetal [35].

Se ha descripto en hígado y cerebro de ratas fetales la presencia de sulfatasas capaces de desulfatar la T3 sulfato en T3. Ello, sumado a la T3 que se origina a partir de la deiodasa tipo II, podría proporcionar la T3 necesaria para los tejidos fetales aunque los niveles séricos de esta hormona sean bajos [18].

C5) Iodotironinas en el líquido amniótico

Además del cordón umbilical, madre y feto se hallan vinculados por el líquido amniótico. La concentración de iodotironinas en el mismo reflejan el metabolismo de hormonas tiroideas tanto materno-placentario como fetal. La T3 reversa, la T4 y sus sulfo-conjugados constituyen más del 95% del total de iodotironinas en el líquido amniótico; la concentración de T4 se incrementa progresivamente durante la gestación mientras la concentración de T3 reversa decrece.

Los niveles de T3 en líquido amniótico son relativamente bajos pero los de T2 (producto de la deiodinación del anillo interno de T3 o del anillo externo de T3 reversa) son 2 ó 3 veces mayores que en suero materno, demostrando la acción de la desiodasa tipo III.

La inyección de 700µg de T4 en líquido amniótico a 5 embarazadas a término produjo un aumento de 13 veces en los niveles de T3 y de 30 veces en los de T3 reversa medidos 24 horas más tarde, al momento del parto. Los niveles hormonales maternos no se incrementaron pero sí lo hicieron las concentraciones de T4 y T3 en cordón y se bloqueó el pico de TSH neonatal. Del mismo modo, iodotironinas maternas que pasan al líquido amniótico pueden luego ingresar en la circulación fetal, tal como se mencionó al referirnos a transferencia placentaria [14].

Conclusiones

El conocimiento de las alteraciones del eje hipotalamo-hipófiso-tiroideo que ocurren durante el embarazo en una mujer eutiroidea, permite diferenciar cambios meramente fisiológicos en los niveles hormonales de aquellos otros que implican patología. Los avances en investigación sobre transferencia placentaria avalan la importancia de la contribución materna, sobre todo en la primera mitad de la gesta, cuando el aporte de T4 de la madre es primordial para el adecuado desarrollo psiconeurológico del feto particularmente en áreas yodo deficientes. La fisiología tiroidea fetal presenta características peculiares básicamente para favorecer procesos anabólicos y evitar una excesiva catabolia proteica. Niveles hormonales medidos en líquido amniótico y/o en cordón umbilical pueden ser útiles para evaluar función tiroidea fetal en aquellas circunstancias en que se sospeche una alteración en la misma y permitir iniciar un tratamiento “in utero” en caso de ser necesario.

Bibliografía

1. Robbins, J.; Nelson, JH. Thyroxine-binding by serum protein in pregnancy and in the newborn. J Clin Invest 37:153-159,1998.
2. Contempré, B.; Jauniaux, E.; Calvo, R. y col. Detection of thyroid hormones in human embryonic cavities during the first trimester of pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 77:1719-1722,1993.
3. Calvo, R.; Obregón, MJ.; Escobar del Rey, F. y col. The rat placenta and the transfer of thyroid hormones from the mother to the fetus. Effects of maternal status. Endocrinology 131:357-365,1992.
4. Glinoer, D.; Delange, F. The potential repercussions of maternal, fetal and neonatal hypothyroxinemia on the progeny. Thyroid 10: 871-887,2000.
5. Haddow, JE.; Palomaki, GE.; Allan, WC. y col. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. N Engl J Med 341:549-555,1999.
6. Pop, VJ.; Kuijpens, JL.; Van Baar, AL. y col. Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy. Clin Endocrinol 50:149-155,1999.
7. Ain, KB.; Mori, Y.; Refetoff, S. Reduced clearence rate of thyroxine-binding globulin (TBG) with increased sialylation; a mechanism for estrogen-induced elevation of serum TBG concentration. J Clin Endocrinol Metab 65 :686-696,1987.
8. Mestman, JH.; Goodwin, M.; Montoro, M. Thyroid disorders of pregnancy. In Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 14(1):41-70,1995.
9. Glinoer, D.; Nayer, P.; Bordoux, P. y col. Regulation of maternal thyroid during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 71:276-287,1990.
10. Ramsden, DB.; Sheppard, MC.; Sawers, RS. y col. Serum free thyroxine concentrations in normal euthyroid subjects and ones with high serum thyroxine binding globulin concentration. Clin Chem Acta. 130:211,1983.
11. Franklin, JA.; Sheppard, MC.; Ramsden, DB. Serum free thyroxine and triiodothyronine concentrations in pregnancy. Br Med J 287:394-401,1983.
12. Guillaume, J.; Schussler, GC.; Goldman, J. Components of the total serum thyroid hormone concentrations during pregnancy: high free thyroxine and blunted thyrotrophin (TSH) response to TSH releasing hormone in the first trimester. J Clin Endocrinol Metab 60:678-684,1985.
13. Price, A.; Griffiiths, H.; Morris, BW . A longitudinal study of thyroid function in pregnancy. Clin Chem. 35:275-281,1989.
14. Bur row, GN.; Fisher, DA.; Reed Larsen, P. Maternal and Fetal Thyroid function. N Engl J Med 331(16):1072-1078,1994.
15. Yamamoto, T.; Amino, N.; Tanizawa, O. y col. Longitudinal study of serum thyroid hormones, chorionic gonadotropin and thyrotrophin during and after normal pregnancy. Clin Endocrinol (Oxf) 10:459-468,1979.
16. Kannan, V.; Sinha, MK.; Devi, PK. y col. Plasma thyrotropin and its response to thyrotropin releasing hormone in normal pregnancy. Obstet Gynecol 42:547-554,1973.
17. Glinoer, D. What happens to the normal thyroid during pregnancy? Thyroid 9(7):631-635,1999.
18. Glinoer, D. The regulation of thyroid function in pregnancy: pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology. Endocr Rev 18:404-433,1997.
19. Hershman, JM. Human Chorionic Gonadotropin and the Thyroid: Hyperemesis gravidarum and Trophoblastic tumors. Thyroid 9(7):653-657, 1999.
20. Vassar t, G.; Dumont, JE. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocite function and growth. Endocr Rev 13:596-611,1992.
21. Braunstein, GD.; Herschman, J. Comparison of serum pituitary thyrotropin and chorionic gonadotropin concentrations throgh out pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 42:1123-1126, 1976.
22. Pekonen, F.; Alfthan, H.; Stenman, UH. y col. Human Chorionic Gonadotropin (HCG) and thyroid function in early human pregnancy: circadian variation and evidence for intrinsic thyrotropic activity of HCG. J Clin Endocrinol Metab 63:853-856,1988.

23. Tunbridge, WMG.; Hall, R. Thyroid function in pregnancy. Clin Obstet Gynecol 2:381-386,1975.
24. Glinoer, D. Maternal thyroid function in pregnancy. J Endocrinol Invest 16:374-378,1993.
25. Prati, M.; Calvo, R.; Mor reale de Escobar, G. Levothyroxine and 3, 5, 3' - triiodothyronine concentrations in the chicken egg and in the embryo before and after the onset of thyroid function. Endocrinology 130:2651-2659,1992.
26. Ferreiro, B.; Bernal, J.; Goodyer, CG. y col. Estimation of nuclear thyroid hormone receptor saturationin human fetal brain and lung during early gestation. J Clin Endocrinol Metab 67:853-856,1988.
27. Fisher, DA.; Lehman, H.; Lackey, C. Placental transport of thyroxine. J Clin Endocrinol Metab 24:393-400,1964.
28. Vulsma, T.; Gons, MH.; De V ijlder, JJM. Maternal fetal tranfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. N Engl J Med 321:13-16,1989.
29. Bernal, J.; Pekonen, F . Ontogenesis of the nuclear 3, 5, 3'-triiodothyronine receptor in the human fetal brain. Endocrinology 114:677-679,1984.
30. Morrealle de Escobar, G.; Obregón, M.; Escobar del Rey, F. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia?. J Clin Endocrinol Metab 85: 3975-3987,2000
31. De Zegher, F.; Pernasetti, F.; Vanhole, Ch. y col. The prenatal role of thyroid hormone evidenced by fetomaternal PIT1 deficiency. J Clin Endocrinol Metab 80:3127-3130,1995.
32. Thorpe-Beeston, JG.; Nicolaides, KH.; Snijders, RJM. y col. Fetal thyroid stimulating hormone response to maternal administration of thyrotropin releasing hormone. Am J Obstet Gynecol 164: 1244-1247,1991.
33. De Zegher, F.; Spitz, B.; Devlieger, H. Prenatal treatment with thyrotropin releasing hormone to prevent neonatal respiratory distress. Arch Dis Child 67:450-454,1992.
34. Smyth, P.P.A. Variation in iodine handling during normal pregnancy. Thyroid 9(7):637-642, 1999.
35. Wu, S.; Polk, D.; Chen, W. y col. A 3, 3'-Diiodothyronine sulfate cross-reactive compaund in serum from pregnant women. J Clin Endocrinol Metab 78:1505-1509,1994.

"El gobierno es bueno cuando hace felices a los que viven bajo él y atrae a los que viven lejos".

CONFUCIO

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol 40 • No. 1
Copyright © 2003 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo

REVISIÓN

El valor diagnóstico de la homocisteína. Utilidad clínica.

Chichizola, C. [1]; Ludueña, Beatriz [1]; Mastandrea, C. [1]; Sánchez, H. [1]

[1] Bioquímicos

Resumen

La cuantificación de homocisteína total (tHcy) es útil para identificar individuos con déficit de cobalamina o de folato; para la determinación de la tHcy como un factor de riesgo para enfermedades tales como las cardiovasculares; y como diagnóstico de homocistinuria. La homocisteína (Hcy) es un aminoácido sulfurado que se forma por la desmetilación de la metionina. Normalmente es catabolizada a cistationina por la enzima cistationina β-sintetaza (CBS), también es remetilada a metionina por las enzimas 5-metiltetrahidrofolato-Hcy metil trasnferasa (metionina sintetaza), cobalamina dependiente y betaína-Hcy metiltransferasa. Tanto las deficiencias vitamínicas como así también los defectos genéticos de alguna de estas enzimas, pueden aumentar las concentraciones plasmáticas de Hcy. El objetivo de nuestro trabajo es describir los últimos avances en el estudio de la patogénesis de la homocisteína en relación a las diferentes enfermedades asociadas, límites de referencias y metodologías analíticas.

Abstract

The quantification of total homocysteine (tHcy) is useful to identify individual with folate or cobalamin deficit; for the determination of tHcy like a factor of risk for diseases such as the cardiovascular ones; and like diagnosis of homocystinuria. The homocysteine (Hcy) is a sulfurated amino acid that forms by the demethylation of methionine. It is normally catalyzed to cystathionine by cystathionine β-synthase, it is also remethylated to methionine by 5-methyltetrahydrofolate-Hcy methyltrasnferase (methionine synthase) -cobalamin dependent enzyme- and by betaine-Hcy methyltransferase. As much the vitaminic deficiencies as thus also the genetic defects of some of these enzymes, can increase the plasma concentrations of Hcy. The objective of our work is to describe the last advances in the study of the pathogenesis of homocysteine in relation to the different associate diseases, reference limits and analytical methodologies.

Dirección postal: Alkemy-Center Lab. San Lorenzo 2780, S3000EUL - Santa Fe.
Tel/Fax: 0342-455-1615
E-mail: centerlab@gigared.com
Palabras Clave: Homocisteína, cisteína, metionina, ácido fólico, tromboembolismo.
Key words: Homocysteine, cysteine, methionine, folic acid, thromboembolism.

Homocisteína: Síntesis y Metabolismo

La Homocisteína es un aminoácido sintetizado a partir de la metionina en reacciones de transmetilación dependiente de la adenosilmetionina.

La remetilación a metionina ocurre por dos enzimas diferentes; en la mayoría de los tejidos esta reacción es catalizada por la metionina sintetasa, la cual requiere cobalamina (vitamina B12) como cofactor y metiltetrahidrofolato como sustrato. El metiltetrahidrofolato viene del pool de folato a través de la acción de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), enzima dependiente de vitamina B12. Finalmente, la Hcy puede ser convertida a cisteína(el precursor del glutation) en dos reacciones secuenciales dependientes de vitamina B6, de las cuales la primera es catalizada por la cistationina-β-sintetaza. Esta reacción es irreversible bajo condiciones fisiológicas [1,5] (Fig. 1).

Glen y col. [6] demostraron la importancia de evaluar la relación cisteina/homocisteina (Cys/Hcy); esta relación puede reflejar anormalidades en la vía de transulfuración. Se estima que aproximadamente el 1% de la población es heterocigota para la deficiencia de la cistationinaβsintetasa (CBS); la homocisteína total (tHcy) está aumentada y la cisteína total (tCys) se encuentra disminuida en los individuos deficientes de esta enzima, por lo tanto una

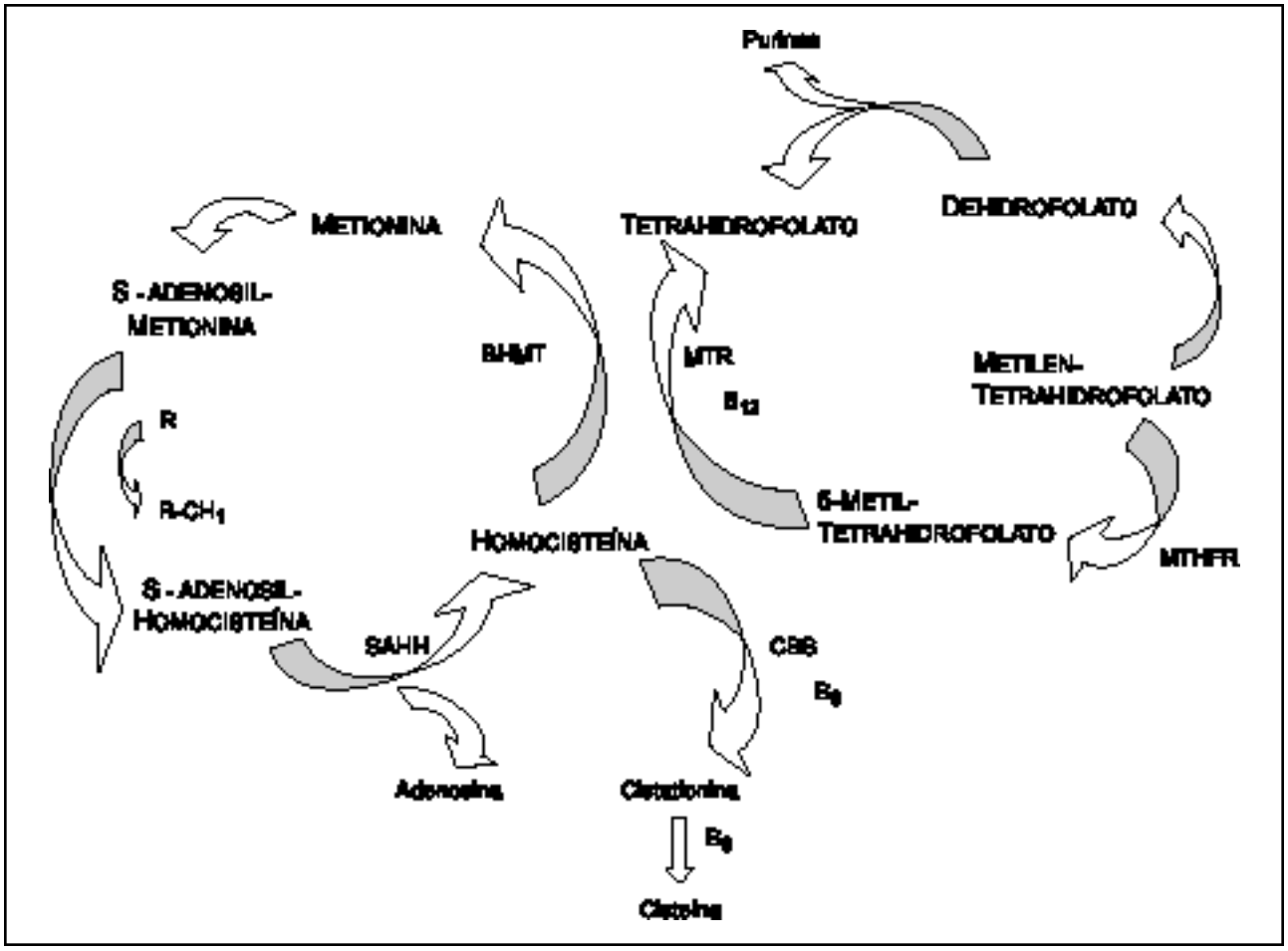


Figura 1. Metabolismo de la Homocisteína. Abreviaturas: BHMT: betaína-homocisteína S-metiltransferasa; SAHH: S-adenisil homocisteína hidrolasa; CBS: cistationina β-sintetasa; MTR: metoinina sintetasa; MTHFR: metil tetrahidrofolato reductasa [1].

relación Cys/Hcy baja identificaría a los heterocigotos [7].

La Hcy se encuentra en el organismo bajo diferentes formas. La homocisteína que se analiza es la forma reducida (HcyH) y se refiere específicamente a la forma sulfidrilo (SH-), y la forma oxidada llamada homocistina (Hcy-Hcy) que es el dímero de homocisteína. La tHcy indica la concentración de HcyH (reducida) obtenida después de un tratamiento de la matriz, usualmente suero o plasma, con un agente reductor [1,3,4,6,7].

Mecanismo de acción

El rol exacto de la Hcy en la patogénesis de la enfermedad vascular es desconocido; si bien existe una evidencia considerable que la Hcy total plasmática elevada puede afectar adversamente el endotelio vascular. El sitio blanco intracelular y extracelular de la Hcy es dependiente del transporte de membrana, un área muy escasamente investigada [8,12].

Budy y col. [8] concluyeron que uno de los posibles mecanismos más importantes de la inducción de la disfunción celular de la Hcy es la modulación de la actividad biológica de blancos intra y extracelulares. Esto es posible por una interacción directa, o bien por interferencia con compuestos bioesenciales, tales como la cisteína. Se sugiere que la Hcy puede usar los sistemas de transporte de la cisteína para ingresar a las células endoteliales de la aorta humana. La Hcy aumentada en las células vasculares puede causar disfunción debido a que estas células tienen una limitada capacidad para catabolizarla. Encontraron también que la Hcy inhibe la captación de cisteína. El transporte dañado de la cisteína a las células vasculares en pacientes hiperhomocisteinémicos puede producir disfunción celular como un resultado de la depleción de cisteína, con una consiguiente síntesis proteica defectuosa y un daño celular oxidativo debido a una disminución en los niveles de glutation.

Otra hipótesis sería que debido a que la Hcy sufre oxidación in vivo, los radicales libres (productos de oxidación de la Hcy) tales como el peróxido de hidrógeno, el radical anion superóxido, y otras especies reactivas serían los agentes injuriosos [13,14].

Según otros autores [15,16], la homocisteína tiolactona puede ser la forma molecular crítica en la patogénesis de la ateroesclerosis. En cultivos celulares, la Hcy tiolactona es sintetizada a través de la reacción de la metionil-tRNA sintetasa. Esta enzima reacciona con los grupos aminos libres de las proteínas y une a éstos una molécula de Hcy formando así la Hcy tiolactona (también denominada homocistamida). Este mecanismo se conoce con el nombre de homocisteinilación. La toxicidad de este último metabolito hacia las células se demostró en experimentos in vivo e in vitro.

La homocisteinilación incrementa la internalización de la LDL por macrófagos. La Hcy tiolactona se combina con la apolipoproteína B de las LDL colesterol. Cuando se oxidan los grupos sulfhidrilos, las LDL se tornan más densas, se agregan y precipitan espontáneamente. Estos complejos son tomados por las células fagocíticas de la pared arterial (las células espumosas) y posteriormente se depositan colesterol y otros lípidos sobre la pared. El ciclo se completa cuando la Hcy liberada de las LDL degradadas se autooxida para formar superóxido y peróxido de hidrógeno, los que estimulan la proliferación de las células del músculo liso de las arterias, llevando a la formación de la placa ateromatosa. Por otro lado, la LDL homocisteinilada despierta una respuesta autoinmune. La Hcy tiolactona hidrolasa está presente en el plasma humano; esta enzima puede hidrolizar la Hcy tiolactona a Hcy, con lo cual se previene la homocisteinilación de las proteínas [16]. (Fig. 2)

En la circulación, la Hcy se encuentra en una forma libre, y una forma proteica unida a la albúmina, representada por el 70 % de la tHcy. En un estudio se pudo confirmar, la presencia de una tercera fracción de Hcy: el tipo unida a péptidos. La Hcy tiolactona, la forma bioactiva de la Hcy, posee un componente éster intramolecular que es capaz de unirse a las proteínas bajo condiciones fisiológicas. Observando las características químicas de la Hcy tiolactona, se cree que la fracción peptídica de la Hcy identificada en este estudio deriva de la homocisteína tiolactona [15].

Las causas más comunes de hiperhomocisteinemia son las bajas concentraciones de folato, la deficiencia de vitamina B12, la insuficiencia renal y el genotipo dominante del polimorfismo 677C→T/MTHFR en conjunción con el déficit de folato.

Por otro lado, la enfermedad heterocigota para

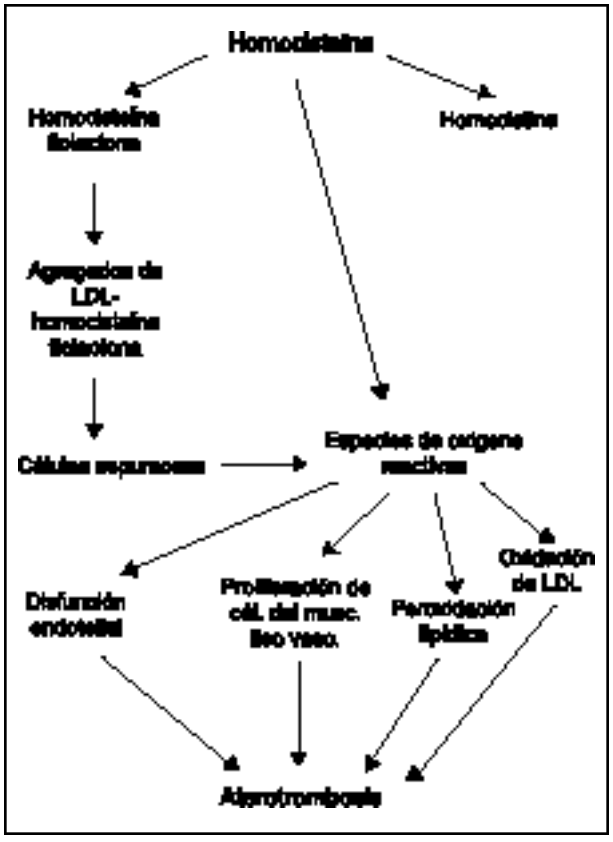


Figura 2. Efectos vasculares adversos de la homocisteina [17].

la deficiencia de cistationina βsintetasa (CBS) está asociada con concentraciones normales o leves aumentos de Hcy y frecuentemente con una respues ta anormal a la sobrecarga de metionina [18,20].

Deficiencia Vitamínica

Es importante comprender la relación entre homocisteina y ácido fólico, vitamina B12, y vitamina B6; debido a que, en la mayoría de los individuos, una nutrición óptima con respecto a estas vitaminas significa mantener bajas concentraciones de tHcy [13].

La deficiencia de folato puede ser consecuencia de un dieta pobre, malabsorción, alcoholismo o uso de drogas, y es común a todas las edades y durante el embarazo. La prevalencia de deficiencia de folato en los EE.UU. era de aproximadamente el 20% antes de la fortificación de alimentos con ácido fólico, pero ahora es de <2%.

La deficiencia de cobalamina (vit.B12) es a menudo más frecuentemente observada en la ancianidad , donde la causa es usualmente la pérdida de factor intrínseco (anemia perniciosa) o atrofia gástrica, y frecuentemente en recién nacidos. Las causas independientes de la edad incluyen una dieta vegetariana y el uso de ciertas drogas [1].

El status de folato es considerado uno de los determinantes más importantes en la concentración de Hcy en plasma, y la suplementación de ácido fólico disminuye la concentración de Hcy plasmática [9,18-23]. Si bien la deficiencia de folato es rara en poblaciones que consumen alimentos fortificados con ácido fólico, aun existe en ciertos grupos poblacionales [1,9].

La deficiencia intracelular de cobalamina puede aumentar las concentraciones plasmáticas de tHcy, la transcobalamina es el transportador plasmático que distribuye vitamina B12 a las células, por lo tanto una variación genética en el gen que codifica para este transportador puede afectar la disposición intracelular de vitamina B12 y consecuentemente las concentraciones de tHcy [24].

La deficiencia de cobalamina en infantes generalmente es debida a un pobre status de esta vitamina en la madre, quien es usualmente asintomática. Además, los infantes alimentados exclusivamente por amamantamiento o cuyas madres son vegetarianas, están en mayor riesgo [1]. Además, está demostrado que la deficiencia de vitamina B12 está asociada con una función ventricular izquierda disminuida [25].

La mayor prevalencia de hiperhomocisteinemia en vegetarianos y veganos es una consecuencia de la deficiencia de vitamina B12 (los alimentos vegetales carecen de vitamina B12) [26]. Bajo condiciones de baja ingesta de metionina (proteínas vegetales) prevalece el camino de remetilación del metabolismo de la Hcy que depende de la vitamina B12 y del ácido fólico. Los vegetarianos tienen altos niveles de ácido fólico. En un estudio se observó la reducción de Hcy por ingesta de vitamina B12, en adultos sanos bajo nutrición alternativa con deficiencia en vitamina B12 e hiperhomocisteínemia. Se observó que el nivel de Hcy se redujo en un 43%. La nutrición de los veganos (sólo alimentos vegetales) conduce a un riesgo en este aspecto (se encontró

hiperhomocisteínemia en el 86% de veganos). Esto significa que es necesario el tratamiento con vitamina B12 o suplementaciones farmacéuticas preparadas [12,26,27].

Un status bajo de vitamina B6 traería como consecuencia un aumento de las concentraciones de tHcy plasmática, particularmente luego de una sobrecarga con metionina, debido a que el piridoxal-5'-fosfato (PLP) (la forma activa de la vitamina B6) es una coenzima para dos enzimas (cistationina β-sintetasa y γ-cistationasa) que irreversiblemente convierten la homocisteína a cisteína [22,23,28].

McKinley y col. [29] demostraron que la vitamina B6 reduce efectivamente las concentraciones de tHcy plasmática en personas adultas sanas.

Enfermedad Cardiovascular

La literatura indica que la tHcy elevada es un riesgo de enfermedad coronaria, cerebrovascular y ateroesclerótica periférica, también como trombosis venosa y arterial. Si bien el rol que juega la homocisteína en la aterogénesis, ateroesclerosis, y trombosis es desconocido, estudios recientes sugieren que la hiperhomocisteínemia puede alterar las funciones del endotelio vascular que llevaría a la conversión de su superficie que usualmente posee actividad anticoagulante a una que se comporta como procoagulante. Un nivel de tHcy elevado está asociado con un riesgo significativamente más alto de estas enfermedades comparado con niveles bajos. Además, la tHcy en plasma es independiente de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) convencionales, pero puede interactuar con ellos acrecentando su efecto Un nivel elevado de tHcy parece ser un factor de riesgo fuerte para un evento de ECV o muerte en pacientes con ECV, insuficiencia renal, diabetes, y lupus eritematoso sistémico [9-11,13,18,30-32].

No obstante, existe un escepticismo con respecto al rol causal de tHcy en la ECV. Por ejemplo, la enfermedad homocigota para el gen MTHFR (polimorfismo 677C→T) causa niveles elevados de tHcy pero no parece ser un factor de riesgo significativo [1].

Varios experimentos clínicos a gran escala se están realizando para testear los efectos de la terapia para disminuir la tHcy. Algunos datos preliminares sugieren que la terapia con vitamina B12 puede reducir el riesgo de eventos de la ECV, retrasa la progresión de ateroesclerosis, y reduce la velocidad de reestenosis coronaria luego de una angioplastía coronaria. Sobre todo, los datos publicados sugieren que el screening de tHcy en la población general tiene poca importancia en el riesgo primario de prevención de ECV; de cualquier forma, en las poblaciones de alto riesgo, un nivel elevado de tHcy es un factor de riesgo pronóstico de nuevos eventos y mortalidad [30,33].

Kerins y col. [34] reportaron que la S-adenosylhomocysteine (SAH)–metabolito intermedio en la conversión de metionina a homocisteína- es un marcador más sensible de enfermedad cardiovascular clínica que la tHcy plasmática. Ellos postulan que las concentraciones de SAH plasmáticas reflejan las concentraciones se SAH tisulares y su hipótesis es que la SAH podría ser el componente clave en la patofisiología de la enfermedad vascular relacionada con la homocisteína.

En un estudio, se midió la homocisteína total plasmática en el Staff Médico Militar de Gulhane (Ankara, Turquía) y luego se hizo el test de sobrecarga con metionina para investigar la capacidad de desarrollar riesgo de infarto de miocardio. Los niveles de homocisteína plasmática total en pacientes ateroescleróticas fueron significativamente más altos que el grupo control. Por otro lado se midieron los niveles de homocisteína luego de dos horas de la carga con metionina en el grupo control y también en pacientes ateroescleróticos. También se midió ácido fólico y vitamina B12 en ambos grupos; tanto los niveles de ácido fólico como de vitamina B12 fueron significativamente más bajos que en el grupo control. En conclusión se encontró que los niveles de ácido fólico y de vitamnina B12 son más bajo en pacientes ateroescleróticos [35].

Tanto el café filtrado como el no filtrado parecen ser factores que aumentan las concentraciones plasmáticas de tHcy. Urgert y col. [36] encontraron que la consumición diaria de 1 litro de café filtrado fuerte incrementa la concentración de tHcy plasmática en ayuno en aproximadamente un 30%.

Un nuevo estudio noruego ha demostrado que los bebedores de café que dejan de tomar café filtrado cafeínado disminuyen sus niveles de colesterol y de homocisteína [67].

Trombosis venosa profunda.

La trombosis venosa profunda (TVP) se refiere a la formación de un trombo (coágulo sanguíneo) en una vena profunda, comúnmente en el muslo o en la pantorrilla. El coágulo sanguíneo puede bloquear parcial o totalmente el flujo sanguíneo de la vena. Se investigaron los niveles de Hcy en pacientes con TVP y se encontró que los niveles aumentados de Hcy en plasma pueden tener un rol causal de desarrollo de TVP [18,37,38]. El tromboembolismo venoso, arterial o ambos es la causa más importante de muerte en pacientes homocigotas para homocistinuria [38].

Desórdenes Psiquiátricos

Se requieren niveles óptimos de cobalamina y folato para una función mental normal. La anemia perniciosa, aunque raramente, está asociada con un número de síntomas psiquiátricos, incluyendo psicosis, paranoia, depresión, comportamiento violento, cambios de personalidad, deterioro de la memoria, y demencia. Recientemente, niveles normales-bajos de folato y cobalamina y/o altos niveles de tHcy se asociaron con desórdenes psiquiátricos comunes, tales como depresión, la enfermedad de Alzheimer, y demencia vascular. En un estudio reciente se estimó que la tHcy aumentada puede estar relacionada con un 15% del total de las demencias. La realidad es que estas deficiencias de vitaminas sugieren que el estatus vitamínico debería ser examinado en todos los pacientes con desórdenes mentales inexplicables [1,65].

Pezzini y col. llevaron a cabo un seguimiento de 1.092 personas sin demencia que fueron incluidos en un estudio realizado entre 1976 y 1978. Se midieron los niveles de homocisteína entre 1979 y 1982, y de nuevo entre 1986 y 1990. Tras un seguimiento medio de 8 años, 111 participantes habían desarrollado demencia, de los cuales 83 presentaban Alzheimer. Según los resultados, aquellos individuos que presentaron mayores niveles de homocisteína tienen el doble de probabilidades de desarrollar demencia o enfermedad de Alzheimer que los que tuvieron los niveles más bajos [66].

Un estudio publicado en el "American Journal of Clinical Nutrition" muestra que elevados niveles plasmáticos de homocisteína se asocian a pérdida de memoria en ancianos [68].

Embarazo y nacimiento

La hiperhomocisteínemia materna y los bajos niveles de vitaminas se asociaron con defectos en el tubo neural, síndrome de Down y otros defectos. Además, las deficiencias de folato y cobalamina son causas de infertilidad. La tHcy elevada se cree que causa una vasculopatía placentaria lo que está relacionado con preeclampsia. Otras complicaciones relacionadas incluyen pérdida temprana del embarazo, parto prematuro, bajo peso al nacer, y separación violenta o infarto de la placenta [1,39].

El rol de la medición de la tHcy en relación al embarazo aun no está establecido y el screening no está aun extensamente recomendado. En mujeres que han experimentado complicaciones en el embarazo o tuvieron un bebe con defectos, se debe evaluar el estatus de folato y cobalamina [1,13].

Los niveles aumentados de Hcy en plasma en la mujer embarazada con preeclampsia se documentaron anteriormente, pero está cuestionado si el aumento de Hcy precede el desarrollo de preeclampsia. En estudios realizados en este tipo de población se encontró que los valores medios de homocisteína en suero en las pacientes con preeclampsia y en pacientes normotensos no fueron significativamente diferentes unos de otros, esto llevó a los autores a concluir que la hiperhomocisteínemia no predice la preeclampsia [40].

Insuficiencia renal crónica

La hiperhomocisteínemia es un hallazgo común en pacientes con enfermedad renal en estadio terminal y es un riesgo de complicaciones ateroescleróticas en estos pacientes [18,22].

En un estudio se observaron los cambios de la homocisteína total en ayuno en pacientes hemodializados (HD) y en pacientes enfermos renales terminales (ERT) y su relación con los eventos del sistema cardiovascular (ECV) en estos pacientes. La tHcy plasmática mostró una disminu-

ción no significativa en el grupo de HD comparado con el grupo ERT. Los valores de tHcy en ayuno fueron más altos en pacientes que experimentaron ECV. En el grupo HD, la tHcy estuvo más aumentada en pacientes con función renal dañada. En ambos grupos la tHcy mostró una correlación positiva con el colesterol y los triglicéridos séricos. Se concluyó que la tHcy puede ser identificada como un factor de riesgo para la enfermedad coronaria en pacientes HD y ERT. El transplante renal podría llevar a un mejor éxito como el porcentaje de ECV disminuido en el grupo ERT (16%) comparado con el grupo HD (26%) [41].

Homocistinuria

Homocistinuria se refiere a un defecto del metabolismo de la cisteína en el nacimiento que lleva a niveles marcadamente elevados de tHcy. La causa más común es la deficiencia de cistationinaβ sintetasa (CBS), pero la falla en la remetilación de la homocisteína debida a defectos en los caminos del metabolismo de la cobalamina, en MTHFR, y en la metionina sintetasa también puede ocurrir [9].

La prevalencia mundial de la deficiencia de CBS es de aproximadamente 1:300000, pero varía marcadamente por región. Análisis genéticos recientes sugieren que la homicistinuria puede ser común, aproximadamente 1:20000. Con las técnicas de medición de tHcy, tales como el ELISA y cromatografía gaseosa con espectrometría de masa (GC-MS), los bebés podrían ser fácilmente testeados para ese defecto [1].

Los signos clínicos de homocistinuria incluyen retraso mental, anormalidades esqueléticas, ectopía lentis, miopía y enfermedad aterotrombótica prematura. Estos individuos excretan grandes cantidades de homocisteína por orina y las concentraciones de tHcy plasmáticas se encuentran aumentadas [13,14].

Independientemente del efecto genético, estos pacientes tienen una tendencia incrementada para la enfermedad tromboembólica prematura. El diagnóstico temprano y el tratamiento de la homicistinuria, preferentemente desde la infancia, puede prevenir los eventos de ECV, también como otros síntomas clínicos [1].

Está demostrado que la suplementación con altas dosis de folato disminuyen la homocisteína y aumenta la excreción urinaria de metionina, el folato es considerado un factor importante en el tratamiento de la homocistinuria [23].

Cuantificación de Homocisteína

Como hemos mencionado, en el plasma humano encontramos la Hcy reducida en cantidades trazas, alrededor del 70% de la tHcy circulante está unida a la albúmina por puente disulfuro, y el 30% restante en formas de disulfitos de bajo peso molecular, unida a péptidos [3,13], y la Hcy oxidada formando dímeros.

La medición de los niveles de tHcy, que incluye la libre (HcyH- reducida), la unida a proteínas y la forma dimérica, fue introducida a mitad de 1980. Hoy son varios los métodos accesibles, pero todos usan el mismo principio.

El plasma o suero primero es tratado con un agente reductor que convierte las diferentes especies de Hcy en la forma reducida. Entre los agentes reductores más usados se citan el ditioeritritol, ditiotreitol y mercaptoetanol. [3,13,45].

Es importante tener en cuenta las condiciones de la toma de muestra, según algunos autores [3,69,70] la sangre debe ser recolectada con EDTA-fluoruro previo ayuno de 12 horas, otros consideran solamente el uso del EDTA Na/K y un ayuno de 8 hs.

Luego centrifugar y separar el plasma rápidamente y conservar a -20 ºC hasta el momento del proceso. El motivo de estas precauciones es que la concentración plasmática de Hcy aumenta considerablemente a temperatura ambiente y en contacto con los glóbulos rojos, debido a que existe una difusión de este aminoácido desde los eritrocitos hacia el plasma. De esto último surge la utilidad de usar el cociente tCys/tHcy como control de calidad interno de posibles errores preanalíticos, como retraso en la separación del paquete globular o inadecuada conservación del plasma [6].

La tHcy plasmática humana fue inicialmente determinada con ensayos radioenzimáticos sobre la conversión de Hcy a S-adenosilhomocisteína en presencia de (^{14}C)adenosina y S-adenosilhomocisteína hidrolasa. Esta técnica es sensible y específica y puede medir también Hcy en orina [3].

La cromatografía y los inmunoensayos son los dos métodos analíticos más utilizados actualmente para la medición de Hcy [3,42-45].

El otro método extensamente usado para la medición de tHyc (y considerado de referencia) es la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), en el cual se utilizan tanto el detector de fluorescencia como el elecroquímico.

Los procedimientos con fluorescencia tienen el paso previo de derivatización posterior al de reducción [3,4,13,46,47]. Los métodos de análisis que combinan HPLC con detección fluorométrica usan benzofurazanes como reactivos derivatizantes que son específicos para los grupos tioles de la Hcy. Los más usados son los halogenosulfonilbenzofurazanes SBD-F (amonio-7-fluorobenceno-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato) y ABD-F (7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol-4-sulfonamida), de los cuales el ABD-F derivatiza con menor fluorescencia y el SBD-F requiere condiciones más drásticas para producir la reacción. Otro reactivo derivatizante citado en la literatura es el monobromobiname. Una de las ventajas de estos métodos cromatográficos es la posibilidad de separar y cuantificar Hcy y Cys en pocos minutos y en una misma corrida sobre columnas de fase reversa[43,48-53]. En la figura 3 se puede observar un cromatograma de una solución de patrones de Hcy, Cys, y cisteamina (usada como estándar interno) (Fig. 3) [48].

Otra metodología alternativa para el análisis de Hcy es la cromatografía gaseosa capilar con espectrometría de masa, técnica usada desde hace tiempo, pero de alto costo instrumental y alta complejidad [13,54,55].

Si bien existen muchos trabajos comparativos entre los métodos inmunológicos y los cromatográficos, aun no existen reglas internacionales para la estandarización y calibración, y las variaciones entre métodos y entre laboratorios no son del todo satisfactorias. Por lo tanto, los laboratorios deberían monitorear la performance del método participando en un programa de control de calidad externo [1].

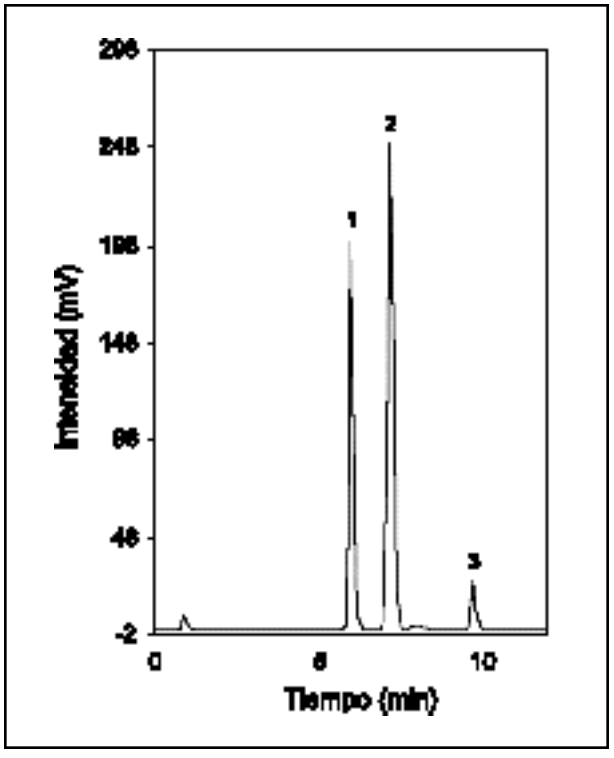


Figura 3. Cromatograma de una solución de Hcy, luego de la derivatización con ABD-F. (1) Cisteina; (2) cisteamina (estándar interno); (3) Homocisteína [48].

Rangos de Referencia

Los valores de referencia para Hcy se definen usualmente como un rango de percentiles de 2.5 a 97.5 de una población asumida como sana, de cualquier forma existe un debate acerca de que los límites de referencia deberían basarse en la medición de tHcy en sujetos normales o sólo en aquellos con un status vitamínico óptimo. La distribución es sesgada a los niveles altos, y a menudo cambios en el estilo de vida o en la ingesta vitamínica cambia marcadamente el límite superior [56-58].

Debido a los efectos marcados de la edad y el embarazo sobre los niveles de tHcy, se deben usar límites de referencia separados para chicos (<15 años), adultos, ancianos (>65 años), y mujeres embarazadas. Una regla simple es que los chicos y las mujeres embarazadas tienen el mismo límite superior de referencia, los adultos tienen un 50% más alto, y los ancianos tienen un 100% más alto [1].

Los hombres típicamente tienen un promedio más alto de tHcy que las mujeres. De cualquier forma, el límite superior para ambos sexos es casi el mismo. Debido al continuo incremento de la tHcy a lo largo de la vida, el límite superior normal no debe ser interpretado estrictamente. La variabilidad

analítica y biológica también contribuye a fluctuaciones. Por otra parte, en sujetos con un estilo de vida saludable o que ingieren alimentos fortificados con ácido fólico o suplementos vitamínicos, un nivel borderline de tHcy (20-30% por debajo del límite superior) debería ser tratado como una deficiencia vitamínica potencial [56,57,59].

Los valores superiores de Hcy basal en hombres respecto a las mujeres se debería a una menor velocidad de remetilación de la Hcy a metionina en el sexo masculino, por lo que la concentración de Hcy circulante es mayor [60].

El Centro del Control de Enfermedades y Prevención de Salud Nacional y Nutrición de los Estados Unidos (NHANES) publicó en Annals of Internal Medicine (1999; 131-331) rangos de referencia para la homocisteína total plasmática, haciendo la diferencia entre sexos y edades. A continuación se detallan dichos valores [61]. (Tabla 1)

La tHcy plasmática en chicos puede ser un biomarcador útil para un riesgo genético de ateroesclerosis prematura [62,63]. El desarrollo de un rango de referencia pediátrico usando inmunoensayos por fluorescencia polarizada (FPIA) ha sido reportado por Pearlman y col. [64], determinando para chicos < 8 años: 2.5 - 8.5 µmol/l y para chicos de 8 a 14 años: 3.0 - 9.5 µmol/l.

Tabla 1	12-19 años	≥ 60 años	Punto de corte para niveles altos
Hombre	4.3 - 9.9 µmol/l	5.9 - 15.3 µmol/l	≥ 11.4 µmol/l
Mujer	3.3 - 7.2 µmol/l	4.9 - 11.6 µmol/l	≥ 10.4 µmol/l

Los intervalos de referencia para madres sanas y poblaciones de recién nacidos son escasos. Una dato importante es que, las concentraciones de tHcy de la madre y del recién nacido parecen ser más bajas en Norte América que en Europa, probablemente debido a los alimentos fortificados. Los factores nutricionales y de estilo de vida parecen tener mayor influencia sobre las concentraciones de homocisteína que los polimorfismos de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) [39].

Claire Infante-Rivard y col. [39] encontraron los siguientes intervalos de referencia para tHcy: Madre: 1.80-9.37 µmol/l; Recién Nacido: 2.02-8.09 µmol/l.

La hiperhomocisteínemia se refiere a niveles de tHcy elevados, y frecuentemente se gradúa como:

Leve <30 µmol/l
intermedia 30-100 µmol/l
o severa >100 µmol/l [1]

Bibliografía

1. Total homocysteine. Helga Refsum, Clin. Lab. News, AACC. Vol 28, Nº 5. Mayo 2002.
2. Risk factors for coronary artery disease. DA Triplett. Hemostasis News. Vol. 6, Nº 1. 2001.
3. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. PM Ueland et al. Clin. Chem. 39:9. 1764-1779. 1993.
4. Homocysteine determination in plasma. B. Peary Solomon et al. Current Separations. 17:1. 1998.
5. Hiperhomocisteínemia. J. D'Eramo et al. Acta bioq. Latinoam. 32:1. 5-26. 1999.
6. Relationships among plasma homocysteine, cysteine, and albumin concentrations: potential utility of assessing the cysteine/homocysteine ratio. L. Glen et al. Clin. Chem. 47, Nº 6. 1121-1123. 2001.
7. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. DW Jacobsen et al. Clin. Chem. 40:6. 1994.
8. Homocysteine transport in human aortic endothelial cells. B. Budy et al. Clin. Chem. 48:6. 2002.
9. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. PM Ueland et al. Am. J. Clin. Nutr. 72:324-332. 2000.
10. Plasma concentrations of total homocysteine predict mortality risk. MR Malinow. Am. J. Clin. Nutr. 74:3. 2001.
11. Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Hordaland Homocysteine Study. SE Vollset et al. Am. J. Clin. Nutr. 74:130-136. 2001.

12. Total homocysteine, vitamin B12 and total antioxidant status in vegetarians. W. Herrmann et al. Clin. Chem. 47:6. 1094-1101. 2001.
13. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. D. W. Jacobsen. Clin. Chem. 44:8(B). 1833-1843. 1998.
14. Homocysteine: biochemistry, measurement, and role in vascular disease. J. G. Donnelly. Biotech Lab International. Jan-Feb. 1998.
15. Protein-bound homocystamide measured in human plasma by HPLC. Y. Uji, et al. Clin. Chem. 48:6. 941-944. 2002.
16. Homocysteine vs cholesterol. D. Cramer. Lab. Med. 29:7. 1998.
17. Homocysteine and atherothrombosis. G. N. Welch et al. The New England J. of Med. 338:15. 1042-1049. 1998.
18. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? L. Brattström and D. EL Wilcken. Am. J. Clin. Nutr. 72:315-323. 2000.
19. Population determinants of homocysteine. SE Vollset et al. Am. J. Clin. Nutr. 73:499-500. 2001.
20. Lifestyle effects on homocysteine and an alcohol paradox. CH Halsted. Am. J. Clin. Nutr. 73:501-502. 2001.
21. Plasma Homocysteine is not subject to seasonal variation. MC McKinley et al. Clin. Chem. 47:8. 1430-1436. 2001.
22. Vitamins as homocysteine-lowering agents. L Brattström. Am. Inst. of Nutr. 1996.
23. Homocysteine, vitamins and arterial occlusive disease: an overview. IH Rosenberg. J. Nutr. 1235S-1237S. 1996.
24. Polymorphisms in the transcobalamin gene: association with plasma homocysteine in healthy individuals and vascular disease patients. K. Lievers et al. Clin. Chem. 48:9. 1383-1389. 2002.
25. Relationship among homocysteine, vitamin B12 and cardiac disease in the elderly: association between vitamin B12 deficiency and decreased left ventricular ejection fraction. BC Herzlich et al. Am. Inst. of Nutr. 1996.
26. Hyperhomocysteinemia and elevated methylmalonic acid indicate a high prevalence of cobalamin deficiency in Asian Indians. H Refsum et al. Am. J. Clin. Nutr. 74:233-241. 2001.
27. Hyperhomocysteinemia-risk of alternative nutrition. P. Blazicek et al. Clin. Chem. 48:6. 2002.
28. Determinants of plasma total homocysteine in the Framingham Offspring cohort. PF Jacques et al. Am. J. Clin. Nutr. 73:613-621. 2001.
29. Low-dose vitamin B6 effectively lowers fasting plasma homocysteine in healthy elderly persons who are folate and riboflavin replete. MC McKinley et al. Am. J. Clin. Nutr. 73:759-764. 2001.
30. Homocysteine and cardiovascular risk. JM Scott. Am. J. Clin. Nutr. 72:333-334. 2000.
31. Plasma homocysteine concentrations in a population with a low coronary heart disease prevalence. JB Ubbink. Am. Inst. of Nutr. 1996.
32. Plasma homocysteine: a risk factor for arterial occlusive diseases. MR Malinow. Am. Inst. of Nutr. 1996.
33. Homocysteinemia and risk of atherosclerosis: a clinical approach to evaluation and management. PB Duell et al. The Endocrinologist. 8: 170-177. 1998.
34. Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. DM Kerins et al. Am. J. Clin. Nutr. 74:723-729. 2001.
35. Plasma homocysteine levels in the Gulhane Military Medical Staff and searching myocard infarction risk. M.M. Alrashed et al. Clin. Chem. 48:6. 2002.
36. Heavy coffee consumption and plasma homocysteine: a randomised controlled trial in healthy volunteers. R Urgert et al. Am. J. Clin. Nutr. 73:107-1110. 2000.
37. Plasma homocysteine levels in subjects with deep-vein thrombosis. M. Keles. Erzurum et al. Clin. Chem. 48:6. 2002.
38. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. M Den Heijer et al. The New Engl. J. of Medic. Vol. 34. Nº12. 759-768. 1996.
39. Perinatal reference intervals for plasma homocysteine and factors influencing its concentration. C. Infante-Rivard et al. Cl. Chem. 48:7. 1100-1102. 2002.
40. Serum homocysteine and subsequent preeclampsia. Hietala R, et al. Obstet. Gynecol. 97: 527-529. 2001.
41. Plasma homocysteine in hemodialysis patients and chronic stable renal transplant recipients. L.N. Kamel et al. Clin. Chem. 48:6. 2002.
42. Standardization (external and internal) of HPLC assay for plasma homocysteine. K Kuo et al. Clin. Chem. 43, Nº 9. 1653-1655. 1997.
43. Evaluation and intermethod comparison of the

Bio-Rad High-Performance Liquid Chromatographic method for plasma total homocysteine. V. C. Dias et al. Clin. Chem. 44: 2199-2201. 1998.
44. Determination of plasma homocysteine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. D. Jacobsen et al. Anal. Biochem. 178: 208-214. 1989.
45. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. P. Ueland et al. Clin. Chem. 39:9. 1764-1779. 1993.
46. High-performance liquid chromatographic method for measuring total plasma homocystine levels. I Fermo et al. J. of Chrom. B. 719. 31-36. 1998.
47. Assay of plasma homocysteine: light sensitivity of the fluorescent 7-benzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid derivative, and use of appropriate calibrators. N. Dudman et al. Clin. Chem. 42: 2028-2032. 1996.
48. Critical role of pH derivatization of homocysteine with benzofurazanes. A. R. Bonfigli et al. Clin. Chem. 47. Nº12. 2001.
49. Laboratory assessment of hyperhomocysteinemia. N. Jacob. Lab Medica International. March-April. 1998.
50. Novel reductant for determination of total plasma homocysteine. B. Gilfix et al. Clin. Chem. 43:4. 1997.
51. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. D. Jacobsen et al. Clin. Chem. 40:6. 873-881. 1994.
52. Fully automated fluorescence assay for determining total homocysteine in plasma. H. Refsum et al. Clin. Chem. 35:9. 1921-1927. 1989.
53. Total homocysteine determination by liquid chromatography before and after methionine loading. Results in cerebrovascular disease. M. Candito et al. J. of Chrom. B. 692. 213-216. 1997.
54. Method for the determination of total homocysteine in plasma and urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. M. J. Magera et al. Clin. Chem. 45:9. 1517-1522. 1999.
55. Comparison of three different plasma homocysteine assays with gas chromatography mass spectrometry. Clin. Chem. 45:5. 670-675. 1999.
56. Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-age and older Chinese men and women in Singapore. SM Saw et al. Am. J. Clin. Nutr. 73:232-239. 2001.
57. Homocysteine: reference values. R. Schreiner et al. Clin. Lab. 43: 1121-1124. 1997.
58. Determination of homocysteine reference intervals: data from the European automated FPIA study. M. G. Staub et al. Clin. Lab. 45: 651-656. 1999.
59. The importance of hyperhomocysteinemia in high age people. W. Herrmann et al. Clin. Lab. 43:1005-1009. 1997.
60. Sex-related differences in methionine metabolism and plasma homocysteine concentrations. NK Fukagawa et al. Am. J. Clin. Nutr. 72:22-29. 2000.
61. NHANES looks at homocysteine on a national level. D. Sainato. Clinical Laboratory News. Vol. 27, Nº 8. 2001.
62. Total homocysteine in pediatric patients. M. A. Vilaseca et al. Clin. Chem. 43: 4. 1997.
63. Selective screening for hyperhomocysteinemia in pediatric patients. M. A. Vilaseca et al. Clin. Chem. 44:3. 1998.
64. Towards pediatric reference and risk ranges for total homocysteine concentration. E. S. Pearlman et al. Clin. Chem. 48:6. 2002.
65. Homocysteine, vitamin B6, and vascular disease in AD patients. J. W. Miller et al. Neurology. 58:1471-1475. 2002.
66. Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease. Sudha Seshadri et al. New Eng. J. of Med. 349:476-483. 2002.
67. Abstention from filtered coffee reduces the concentrations of plasma homocysteine and serum cholesterol-a randomized controlled trial. Benedicte Christensen et al. Am. J. of Clin. Nutr.74:3; 302-307. 2001.
68. Hyperhomocysteinemia associated with poor recall in the third National Health and Nutrition Examination Survey. Martha Savaria Morris et al. Am. J. of Clin. Nutr. 73:5, 927-933. 2001.
69. Addition of sodium fluoride to whole blood does not stabilize plasma homocysteine but produces dilution effects on plasma constituents and hematocrit. Martin Patrick Hughes et al. Clin. Chem. 44:2204-2206. 1998.
70. Short-term and long-term variability of plasma homocysteine measurent. Uttam Garg et al. Clin. Chem. 43:1. 141-145. 1997.

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol 40 • No. 1
Copyright © 2003 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo

INFORME DEL CACDDI-FASEN

PAGINAS PARA RELEER:

Conferencia dictada por el Prof. Dr. John B. Stanbur y en homenaje a la memoria del Prof. Dr. Héctor Perinetti

Durante el Primer Congreso Latinoamericano de Tiroides, celebrado en Mar del Plata en octubre de 1981, el Comité Organizador decidió rendir un homenaje póstumo al entonces recientemente fallecido Prof. Dr. Héctor Perinetti, quien fuera pionero en la investigación del bocio endémico en la República Argentina. Por tal motivo, se invitó al Prof. Dr. John B. Stanbury para que dictase una conferencia magistral, de tipo histórica, sobre la célebre misión argentino-norteamericana que, por primera vez en el mundo, utilizó los radioisótopos para el estudio de la endemia bociosa. Dicha conferencia tuvo como título: "Reflexiones sobre una Visita a Mendoza".

Debido a su extensión, el texto de la disertación traducida al castellano será dividida en 4 partes, que serán publicadas en forma sucesiva en esta sección del CACDDI, que la RAEM nos brinda generosamente.

Primera Parte:

"La Clínica de Tiroides del Massachusetts General Hospital fue establecida en la década del '20 por el Profesor James Howard Means. Sus reuniones de los martes a la tarde llegaron a ser una actividad regular del Hospital, y después de la Segunda Guerra Mundial atrajo a una permanente corriente de visitantes de otros países. Algunos de ellos, como los Dres. Reforzo Membrives y Galli Mainini se quedaron un tiempo como investigadores. A mediados de los '40 Douglas Riggs, del Departamento de Farmacología, desarrolló el primer método confiable para medir el yodo hormonal (PBI) y se convirtió en un participante regular dentro de las actividades de investigación de la Clínica. A comienzos de 1949, con la partida de Rulon Rawson como Jefe de la Clínica, yo asumí esa responsabilidad. Más tarde, en ese mismo año, Gordon Brownell, un joven físico del Massachusetss Institute of Technology, se unió al plantel del hospital y, dada su larga asociación con el MIT para el desarrollo de aplicaciones humanas del radioyodo, se convirtió en un importante colaborador de muchos de los programas de investigación del grupo de tiroides.

Fue en ese contexto que Héctor Perinetti arribó un martes a la tarde en la primavera de 1950. Como profesor de cirugía en la Universidad Nacional de Cuyo, él había tenido una enorme experiencia con el bocio en la Provincia de Mendoza, la cual por siglos fue conocida como una región de intensa endemia. Al cierre de la Clínica, el Profesor Perinetti nos mostró una serie de espectaculares fotografías de sus pacientes. Ninguno de nosotros había visto nada igual. Nuestra reacción inmediata fue proponerle un estudio conjunto, en Mendoza, de casos similares, empleando los, para ese entonces, nuevos métodos de medición de la función tiroidea, incluyendo precisos análisis de yodo inorgánico y hormonal y estudios cinéticos con radioyodo. Perinetti quedó entusiasmado e inmediatamente ofreció su cooperación y las facilidades de su hospital. Los preparativos requirieron más de un año. Hubo que conseguir dinero para equipamiento y viajes. Howard Means fue muy entusiasta y pudo obtener los recursos financieros. Pasaron varios meses hasta que se logró el permiso oficial del Gobierno Argentino. Los suministros tuvieron que ser encargados y despachados a Mendoza. Tuvo que obtenerse el permiso y hacer los arreglos para importar yodo radioactivo. Se tuvieron que desarrollar protocolos de investigación. Finalmente, en junio de 1951, pudimos partir rodeados por muchas incertidumbres. Todo el bagaje electrónico, los reactivos químicos y el material de vidrio fue enviado por barco, sin tener la seguridad de que llegaran a puerto, pasaran las barreras aduaneras y alcanzaran llegar a Mendoza. Aún así, ignorábamos si iban a servir."

Dra. María del Carmen Silva-Croome **Dr. Hugo Niepomniszcze**

Coordinadores del CACDDI-FASEN

Monitoreo de DDI en la Provincia de Misiones (2000).

Escalada, L. F.*; Schaller, R. H.**; Husulak, Elizabeth**; Insaurralde, C.**; Stasiuk, Margarita E.**; Junco, M. °; Sartorio, G.°°; Niepomniszcze, H.°°°*

*Médico Responsable de la Coordinación Local, **Bioquímicos de la Provincia de Misiones, °Bioquímico a cargo del Laboratorio de Yodurias y °°Director Bioquímico de la División Endocrinología del Hospital "Ramos Mejía" de la Ciudad de Buenos Aires, °°°Médico Responsable del Programa de Monitoreo del CACDDI y *División Endocrinología del Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UBA.

Resumen

Un total de 795 niños fue estudiado en este monitoreo de bocio endémico en dos ciudades de la Provincia de Misiones: Apóstoles y Posadas. En la primera se palpó el cuello de 371 alumnos de escolaridad primaria, mientras que se hizo lo mismo con otros 424 de Posadas.

La palpación tiroidea fue llevada a cabo, a cada alumno, por los dos médicos participantes. Sin embargo, con la finalidad de aunar criterios con lo realizado previamente [1,3] se tomó como única referencia la palpación de H.N. La definición del grado de bocio fue similar a la utilizada en los otros relevamientos [1]. Se determinó la yoduria en muestras casuales de orina emitidas por los niños una vez que fueron palpados (318 de Apóstoles y 249 de Posadas). Simultáneamente, se midió el contenido de yodo en 303 muestras de sal de consumo hogareño de Apóstoles y en 205 de Posadas. En la Ciudad de Apóstoles se consideraron separadamente a los alumnos de los turnos mañana y tarde, debido a la marcada diferencia existente en el nivel socio-económico de estos escolares, habiendo sido el de la mañana sustancialmente superior al de la tarde. El examen palpatorio de los niños reveló solamente la existencia de bocio grado 1, con la única excepción de un varón del turno tarde de Apóstoles que tuvo un bocio grado 2. La prevalencia de bocio en la Ciudad de Posadas fue del 19,3%, mientras que en Apóstoles varió significativamente según el turno: 9,5% a la mañana y 18,7% a la tarde ($p<0.01$). Los niveles de yoduria tuvieron, en Posadas, una $\bar{x}$ de 137µg/L y una mediana de 125µg/L. En Apóstoles no hubo diferencias entre las yodurias de ambos turnos, siendo la $\bar{x}$=182µg/L y la mediana=169µg/L. No se encontraron diferencias entre los niños con o sin bocio, ni tampoco según la marca de sal consumida. El contenido de yodo de las sales que consumieron más del 90% de las poblaciones escolares estudiadas, en ambas localidades, fue suficiente. Se contabilizó un total de 17 marcas diferentes de sal, de las cuales 13 tuvieron una concentración de yodo apropiada, con una media promedio de 34,3mg/Kg. Sin embargo, las otras 4 marcas eran muy deficitarias. Tres de ellas fueron consumidas por tan sólo el 0,6% de los alumnos, pero la cuarta, que tuvo un contenido yódico de 7,8±(D.S.)16mg/Kg, llegó a ser consumida por el 8,2% de los niños de Apóstoles y el 2,9% de los de Posadas. A pesar de ello, la prevalencia de bocio fue totalmente independiente de la marca de sal utilizada. Por estos resultados, incluyendo las yodurias, se deduce que tanto en Posadas como en Apóstoles no existe actualmente déficit de yodo. El consumo de mandioca forma una parte importante de la dieta de los pobladores de estas regiones, particularmente de aquellos con bajo nivel socio-económico. Es probable que este hecho explique las diferencias observadas entre los niños de los turnos mañana y tarde de la Ciudad de

Palabras Clave: Bocio endémico, deficiencia de yodo, monitoreo, tiroides y salud pública, sal yodada.
Key Words: Endemic goiter, iodine deficiency, screening programs, thyroid and public health, iodized salt.

Apóstoles. Los alumnos de Posadas, cuyo nivel de pobreza fue equivalente a los de la tarde de Apóstoles, también tuvieron una prevalencia de bocio similar. En base a estos datos, concluimos que el consumo de mandioca podría guardar una relación directa con la alta frecuencia de bocio observada en la Provincia de Misiones.

Introducción

Este monitoreo fue llevado a cabo dentro del marco del Programa del CACDDI patrocinado por Química Montpellier S.A., realizándose en las ciudades de Apóstoles y Posadas, Provincia de Misiones, los días 13 y 14 de abril de 2000. Contó con la participación, en "terreno", de un médico (L.F.E.) y cuatro bioquímicos (R.H.S., E.H., C.I. y M.E.S.) como representantes locales, mientras que del CACDDI fueron, desde Buenos Aires, la Tca. en Procesos de Comunicación y Trabajo Grupal (E.B. Cánovas de la Vega) y el responsable del Programa de Monitoreo. Sus tareas fueron similares a las realizadas en los relevamientos anteriores [1,2,3].

Material y Métodos

Se palpó el cuello de 371 niños de la Escuela Normal Superior "Mariano Moreno" de la Ciudad de Apóstoles y de 424 alumnos de la Escuela Normal Superior "Estados Unidos de Brasil" de la Ciudad de Posadas.

Las palpaciones fueron realizadas, en todos los escolares, por los dos médicos (H.N. y L.F.E.). Al igual que en relevamientos anteriores [3], y con la finalidad de aunar criterios, se tomó como única referencia la palpación de H.N. La metodología usada en este relevamiento se basó en el trípode clásico (palpación tiroidea, recolección de orina y de muestras de sal de consumo hogareño) tal cual fuera descripto en una publicación anterior [1].

Para facilitar el análisis de este monitoreo, se consideró conveniente tratar por separado a ambas localidades.

Apóstoles:

La distribución por edades de los 371 niños se observa en la fig. 1. Este total estuvo constituido por 189 alumnos del turno mañana (101 varones y 88 mujeres) y 182 del turno tarde (90 varones y 92 mujeres). Esta distinción entre ambos turnos fue llevada a cabo en forma deliberada, debido a la marcada diferencia existente en el nivel socio-económico de estos escolares, siendo el de la mañana sustancialmente superior al de la tarde. Se obtuvieron 167 muestras casuales de orina del turno mañana y 151 del turno tarde y se recolectaron 306 muestras de sal de consumo hogareño entre ambos turnos. El contenido yódico se midió en el 100% de las orinas emitidas y en el 99% de las sales traídas por los alumnos.

Posadas:

La distribución por edades de los 424 escolares se muestra en la fig. 2. El total de alumnos se conformó con 227 varones y 197 mujeres. Se obtuvieron 249 muestras casuales de orina y se recolectaron 294 muestras de sal de consumo hogareño. El contenido yódico se midió en el 100% de las orinas emitidas y en el 69,4% de las sales traídas por los alumnos.

Las yodurias fueron determinadas en Buenos Aires por el Laboratorio de Yodurias dependiente de la División Endocrinología del Hospital Municipal "Ramos Mejía". El contenido de yodo en las muestras de sal fue analizado en Córdoba por el Dr. Rolando Pécora. Se utilizó el test del χ^2 para comparar las prevalencias de bocio obtenidas en los escolares de los turnos mañana y tarde de Apóstoles.

Resultados

Apóstoles:

La prevalencia de bocio fue del 9,5% en los alumnos del turno mañana y del 18,7% en los de la tarde. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p<0.01$). Todos los bocios encontrados fueron grado 1, con la única excepción de un varón de 15 años del turno tarde, que tuvo un bocio grado 2. No

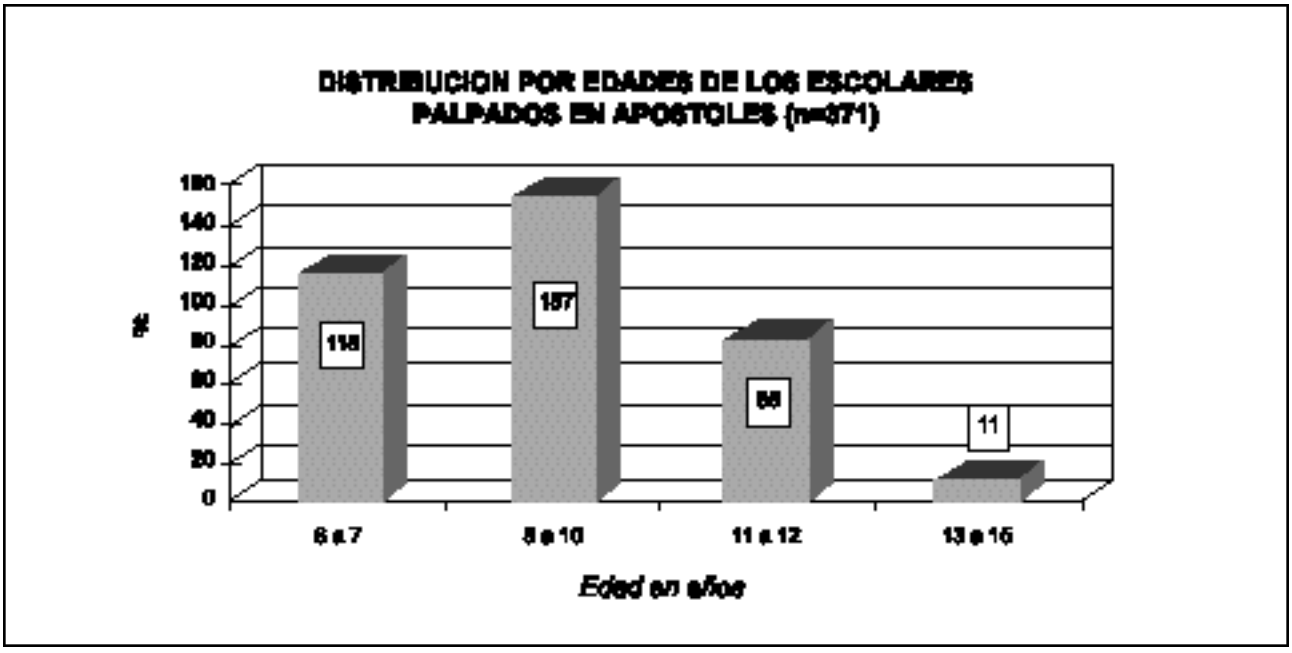


Figura 1. Número de alumnos de Apóstoles distribuidos por edades.

hubo relación alguna entre la frecuencia de bocio y la edad y sexo de los alumnos.

Posadas:

La prevalencia total de bocio fue del 19,3%, no habiendo diferencias entre los turnos mañana y tarde, como en el caso anterior. El nivel socioeconómico de los niños de esta ciudad fue equivalente a los del turno tarde de Apóstoles, pudiéndose observar que la prevalencia de bocio en ambos grupos fue similar (figura 3). Todos los bocios encontrados en Posadas fueron grado 1, solamente uno de ellos (una niña de 6 años) tuvo también un pequeño nódulo. Aquí tampoco hubo correlación alguna entre el hallazgo de bocio y la edad y sexo de los alumnos.

Yodurias:

El contenido de yodo urinario en los escolares de ambas localidades fue normal. No hubo diferencias entre los niños con o sin bocio, como tampoco lo hubo en relación a la marca de sal consumida ni a los turnos mañana y tarde de Apóstoles. Los resultados hallados en las dos ciudades se observan en la tabla 1.

Contenido de yodo en la sal de consumo hogareño:

Se midió el contenido de yodo en 303 muestras de sal de Apóstoles y en 205 de Posadas. Se observó que más del 90% de las poblaciones escolares estudiadas consumieron sal adecuadamente yodada. Se contabilizó un total de 17 marcas diferentes de sal, de las cuales 13 tuvieron una apropiada concentración de yodo, con una media promedio de 34,3mg/Kg. Sin embargo, las otras 4 marcas eran muy deficitarias. Tres de ellas fueron consumidas por el 0,6% de los alumnos, pero la cuarta, que tuvo un contenido yódico de 7,8±(D.S.)16mg/Kg, llegó a ser consumida por el 8,2% de los niños de Apóstoles y el 2,9% de los de Posadas. A pesar de ello, la prevalencia de bocio y el nivel de yodurias fue totalmente independiente de la marca de sal utilizada. En la tabla 2 se muestra el consumo de sal, según la marca comercial, en ambas localidades, mientras

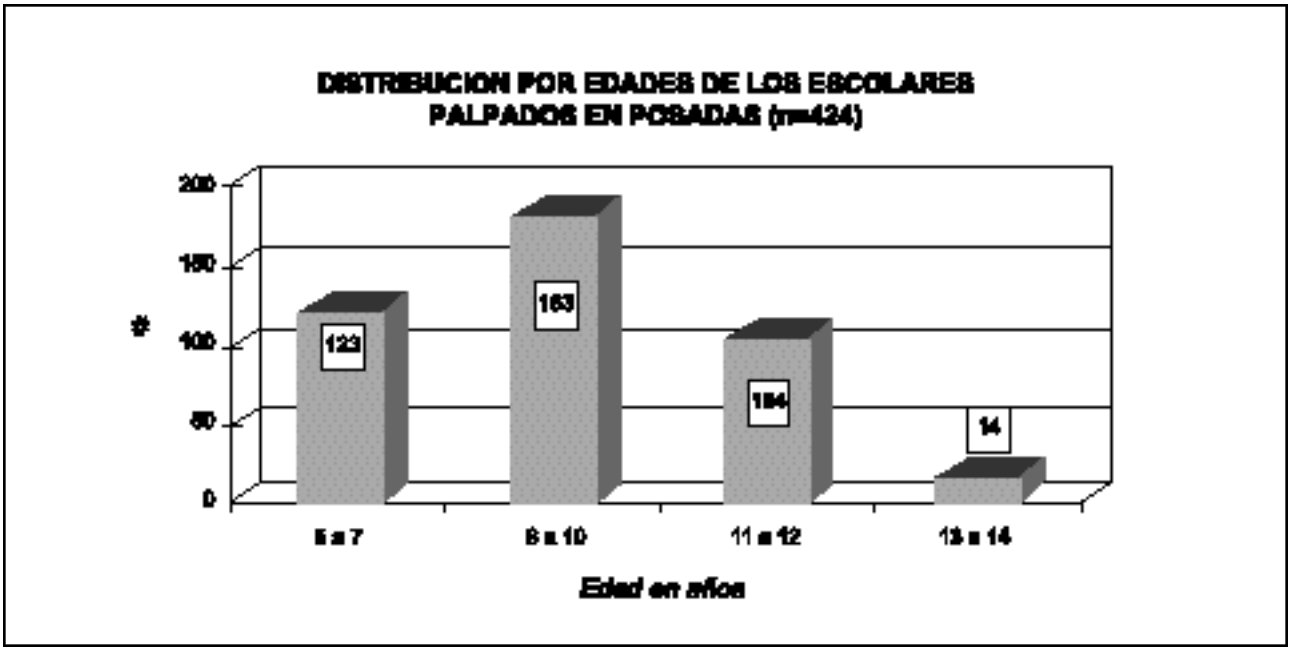


Figura 2. Número de alumnos de Posadas distribuidos por edades.

que en la tabla 3 puede observarse el contenido de yodo en cada marca de sal.

Discusión

Previamente a la profilaxis con sal yodada, la Provincia de Misiones fue una zona de bocio endémico caracterizada por un bajo contenido de yodo en el agua de bebida [4,5], lo que llevaba a sus habitantes a tener yodurias menores a los 50µg/L. En un estudio realizado en escolares de la Ciudad de Apóstoles, hace 4 décadas, se encontró que el 76% de los niños tenía bocio y que el promedio de sus yodurias rondaba los 47µg/día [5]. En esa época, se había observado que la prevalencia de bocio en la población de Misiones era del 41,44%, variando significativamente según las localidades investigadas [5].

Actualmente, luego de 3 décadas después de estar vigente la yodación compulsiva de la sal de consumo humano y animal (Ley Nacional 17.259/67), el panorama de la endemia cambió sustancialmente. Sin embargo, a pesar de que la ingesta de yodo es normal, a juzgar por el valor de las yodurias, la prevalencia de bocio sigue siendo ele-

Tabla 1
YODURIAS EN LA PROVINCIA DE MISIONES
(µg/L)

CIUDAD	$\overline{X}$	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	n
APOSTOLES	182	169	50	488	318
POSADAS	137	125	50	435	249

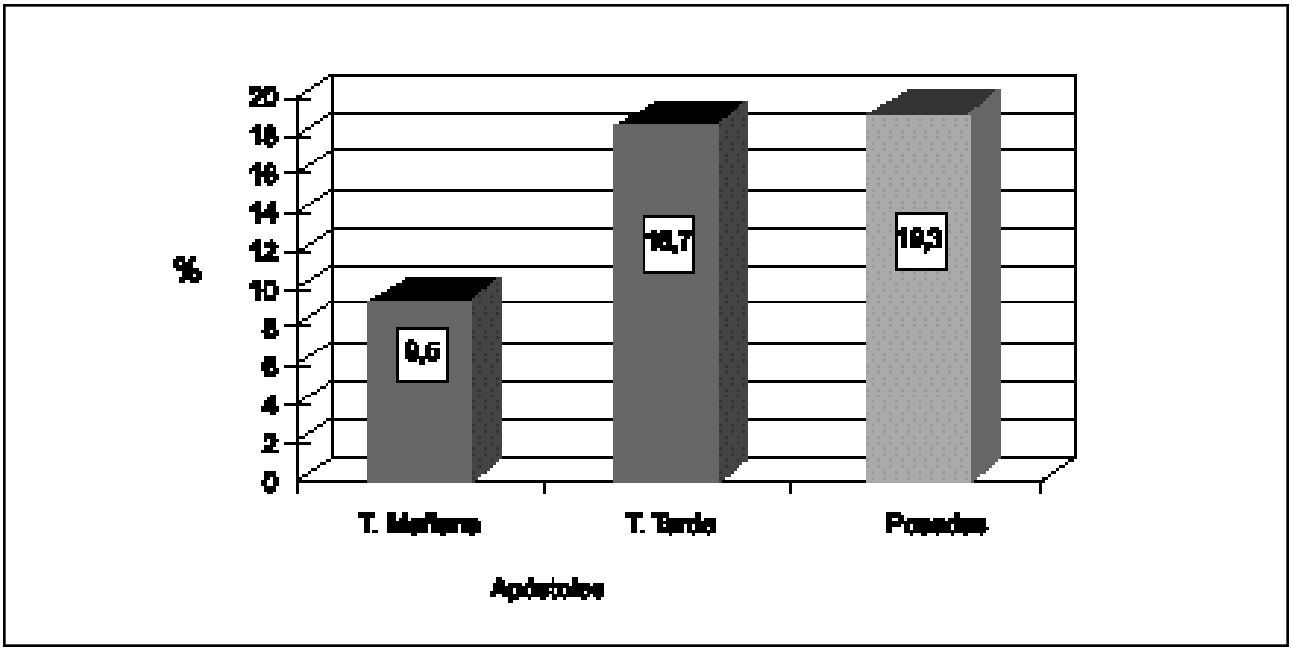


Figura 3. Prevalencia de bocio en la Provincia de Misiones.

vada, aunque con niveles significantemente más bajos que en el pasado. Tanto en Apóstoles como en Posadas, la endemia encontrada por nosotros es leve, dado que es inferior al 20% [6]. Las diferencias observadas entre los turnos mañana y tarde de la Ciudad de Apóstoles guardan relación directa con el nivel socio-económico del alumnado. Es también llamativo el hecho que la prevalencia de bocio de los niños del turno tarde de Apóstoles y la de ambos turnos de Posadas fuera similar, puesto que también lo era su nivel de pobreza. Estos resultados hablan a favor de que hay que considerar a otros factores bociogénicos más allá de la ingesta de yodo, que fue totalmente normal en toda la población estudiada. Por tal motivo, surge la necesidad de analizar la dieta de estos niños y evaluar su posible contenido en sustancias bociogénicas. De esta manera, aparece la mandioca como el principal elemento a tener en cuenta.

Es sabido que el consumo de mandioca, en la Provincia de Misiones, es sustancialmente mayor en las poblaciones carenciadas que en aquellas de buen nivel socio-económico, cuyas dietas son generalmente más variadas y nutritivas. Delange y col. [7] y Gaitán y col. [8] han estudiado minuciosamente a la mandioca como bociógeno natural, observando que su contenido de glucósidos cianogénicos fue causa de bocio en Nigeria, Zaire, Malasia y Brasil. El consumo crónico de mandioca

Tabla 2
Consumo de la sal según la marca

	Localidad	
Marca	***Apóstoles***	***Posadas***
Colosal®	33,2 %	5,4 %
Dos Anclas®	22,4 %	53,7 %
Celusal®	19,7 %	20,0 %
Culminante®	8,2 %	2,9 %
3-Sal®	3,9 %	9,3 %
Resero®	3,3 %	0 %
Haidar®	1,0 %	1,0 %
Otras (incluye 10 marcas)	2,6 %	2,5 %
?	5,6 %	5,4 %

Tabla 3
Contenido de yodo en la sal

Marca	Cantidad ($\bar{x}$ ± D.S.) mg/Kg	% de muestras con <15mg/Kg	Valor del D.S. como % del valor de $\bar{x}$	Rango en mg/Kg	n
Dos Anclas®	29,0 ± 12,3	9,1	42,4	0,5 - 72,9	176
Celusal®	30,9 ± 9,5	4,4	30,7	0,0 - 56,1	113
Colosal®	31,9 ± 12,1	10,8	37,9	0,0 - 54,8	111
3-Sal®	35,7 ± 11,4	0	31,9	18,2 - 55,9	31
Culminante®	7,8 ± 16,0	83,9	205,1	0,0 - 58,9	31
Resero®	22,6 ± 13,7	20,0	60,6	0,6 - 46,2	10
Haidar®	40,2				4
Primicia®	40,6				2
Genser®	37,7				2
Sal-Sul®	34,0				2
Salmikey®	51,8				1
Salitral®	35,9				1
Cris-Sal®	30,6				1
Nobleza Gaucha®	24,6				1
Cisne®	14,4				1
Andina®	12,1				1
Yogal®	0,1				1
?	28,4 ± 16,0	21,7	56,3	0,0 - 51,8	28

pobremente detoxificada produce una elevación plasmática de tiocianato que interfiere con el metabolismo tiroideo del yodo por inhibición de su transporte activo y, eventualmente, su organificación [9].

En el estudio realizado por nosotros en Resistencia [1], observamos un perfil de bocio análogo al encontrado en Apóstoles, es decir, que los alumnos del turno mañana tenían menos bocio que los de la tarde. En esa ocasión también se relacionó esa diferencia con el consumo de mandioca.

Si bien la mandioca aparece como la responsable más probable de la endemia observada en Misiones, también deben considerarse otras alternativas al respecto. La eventual existencia de bociógenos ambientales en el agua de bebida es causa de aumento de tamaño tiroideo en ciertas regiones del planeta [10].

De este estudio, puede concluirse que en la Provincia de Misiones existe una endemia bociosa leve, que al igual que en Resistencia (Provincia de Chaco) no sería ocasionada por un déficit de yodo en la dieta, y que su origen podría atribuirse a bociógenos ambientales, probablemente relacionados con la presencia de mandioca en el régimen alimentario.

Agradecimiento

Agradecemos al Sr. Mario Tomaíno, miembro de la Dirección Médica de Química Montpellier S.A.,

por su valiosa cooperación en la programación logística de esta campaña. Asimismo, hacemos extensivo nuestro reconocimiento al Dr. Héctor Accierto, Director Médico de Química Montpellier, quien con su fundamental apoyo hizo posible que este monitoreo se haya concretado.

Bibliografía

1. Pereyra, A. y col. Monitoreo de DDI en Resistencia, Prov. de Chaco (1999). Rev. Argent. Endocrinol. Metab., 39:121, 2002.
2. Bollada, P. y col. Monitoreo de DDI en la Pcia. de Catamarca (1999). Rev. Argent. Endocrinol. Metab., 39:181, 2002.
3. Mascaró, P. y col. Monitoreo de DDI en la Costa Patagónica (1999). Rev. Argent. Endocrinol. Metab., 39: 243, 2002.
4. Soto, R. J. y col. El Bocio Endémico en la Provincia de Misiones, República Argentina. Rev. Argent. Endocrinol. Metab., 11: 93, 1965.
5. Soto, R. J. y col. Adaptive Mechanism to Iodine Deficiency in Endemic Goiter in Misiones, Argentina. Metabolism, 17: 326, 1968.
6. Pretell, E. A. y col. Consenso sobre los desórdenes por deficiencia de yodo en Latinoamérica. Criterios de evaluación y monitoreo para su erradicación sostenida. Rev. Argent. Endocrinol. Metab., 35:239, 1998.
7. Delange, F. Cassava and the thyroid. In: Gaitan E. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, p.173, 1989.
8. Gaitan, E. y col. Antithyroid effects in vivo and in vitro of babassu and mandioca: a staple food in goiter. Areas in Brazil. Eur. J. Endocrinol., 131:138, 1994.
9. Rizzo, L.; Serra, H. A.; Niepomniszcze H. Farmacología Tiroidea. Parte II. Rev. Argent. Farmacol. Clin., 4:207, 1997.
10. Gaitan, E. Environmental goitrogenesis. Boca Raton FL: CRC Press, p.1, 1989.

"La ociosidad, como el moho,
desgasta mucho más rápidamente que el trabajo".

BENJAMIN FRANLIN

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol 40 • No. 1
Copyright © 2003 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo

INFORME DE DEPARTAMENTO

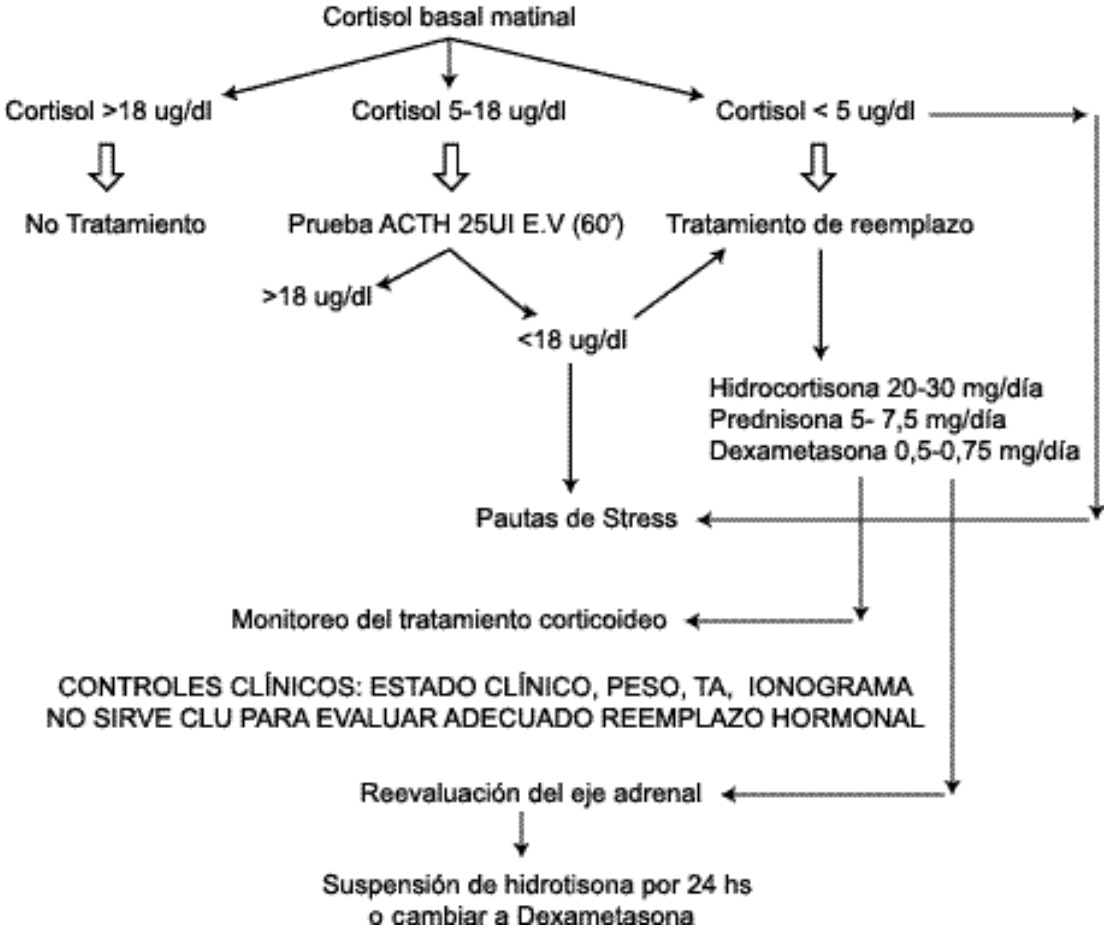
Sistemática del Departamento de Neuroendocrinología de la SAEM

Sistemática de Diagnóstico y Tratamiento de la Insuficiencia Hipofisaria (Panhipopituitarismo)

Guitelman, Mirtha; Fiszlejder, L.; Chervin, A.; Vitale, M.; Fainstein Day, Patricia; Boero, Laura; Mallea Gil, Susana; Poggi, U.; Cornaló, Dora; Alfieri, Analía; Meller, Nora; Manabella, M.; Stalldecker, Graciela

SISTEMÁTICA PANHIPOPITUITARISMO

Eje Adrenal



Otros Test Diagnósticos:
Test de Hipoglucemia Insulínica (ITT): 0,1-0,15 U de Insulina Regular x kg peso
Glucemia <40 y Cortisol >18 ug/dl 30' ,60', 90' - Contraindicado en añosos, enf. cardiovascular, epilepsia.
Test de Metopirona: 30 mg/kg/peso a las 24 hs - Respuesta Normal: 11desoxicortisol >70 ng/ml y Cortisol <5 ug/dl.
Test de CRH: 1mg/kg peso Respuesta Normal: cortisol >20 ug/dl
Test de ACTH baja dosis: 1 microgr ACTH E.V. Respuesta normal: >18 ugldl a los 30' - Se está reviendo el corte post ACTH. Falsos positivos.

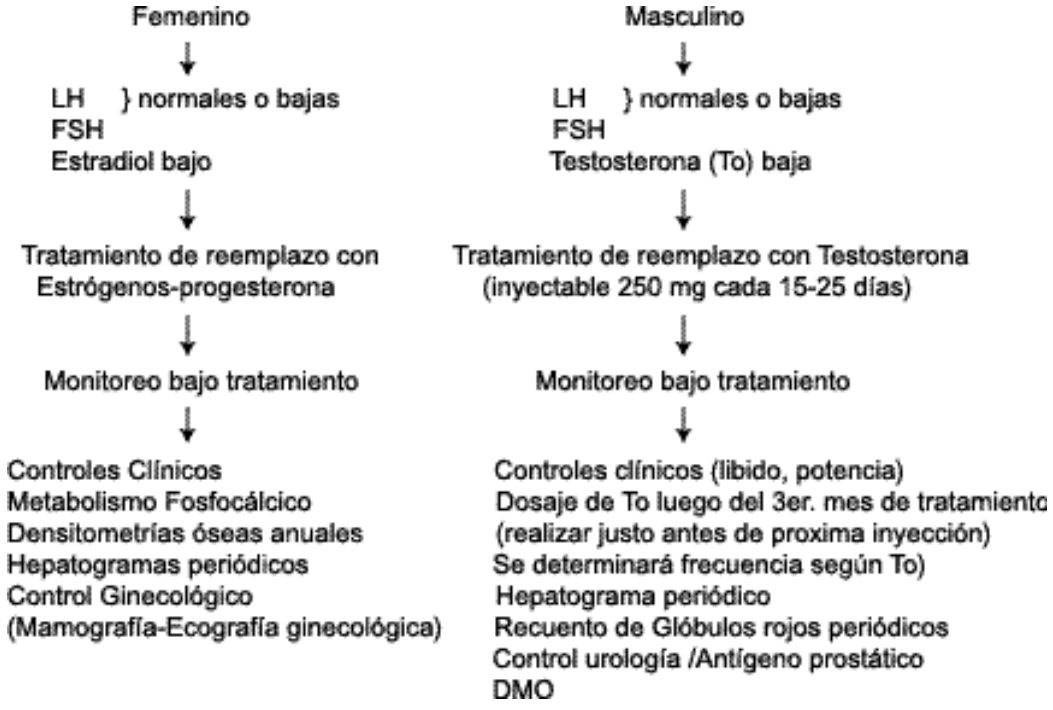
Eje Tiroideo

Se pueden dosar T4 total si no hay disponibilidad de T4L, pero ésta es más sensible.

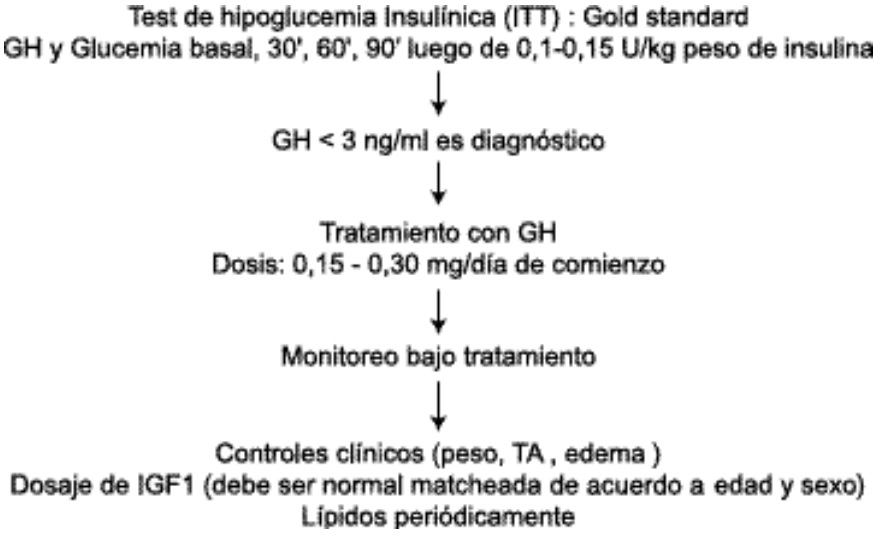
TSH puede estar normal, elevada (en hipotalámicos) o baja. Es de utilidad si hay un hipotiroidismo primario asociado.

Una Prueba de TRH-TSH plana confirma un hipot. Secundario, pero no es necesario para hacer diagnóstico.

Eje Gonadal



Eje Somatotrófico



Otros Test:
GH basal no es útil para diagnótico: es pulsátil , depende de edad, sexo, esteroides gonadales.
IGF1: disminuye con la edad, malnutrición, enf. Crónicas, mujeres.
Test de Arginina
Test de Clonidina
Test de Glucagon

Eje Prolactínico

Los niveles de PRL pueden estar:
Elevados: en general PRL < 100 ng/ml por desconexión tallo.
Bajos: cuando hay destrucción total del lactotropo. En deficiencias totales y severas.
Normales.

Evaluación y tratamiento eje adr enal pre-intra y post Cir ugía Hipofisaria

1- Evaluar en el prequirúrgico con cortisol basal y/o pruebas. Reemplazar si hay déficit.

2- ¿Tratar con corticoides durante la cirugía a todos?. Algunos autores plantean no tratar a los que irán a adenomectomia selectiva (microadenomas) y tienen eje adrenal intacto precirugía.

3- ¿Qué esquema dar en la cirugía?
- 100 mg de hidrotisona en bolo precirugía + 200mg a pasar en 24 hs. Si no hay complicaciones en el segundo día dar la mitad de dosis (150), el tercer día 75 mg, y el cuarto pasar a vía oral en dosis susti-

tutiva, 30 mg/día. Más tarde se evaluará con cortisol basal y/o pruebas tras la suspensión 24 hs de la hidrotisona o pasaje a dexametasona.

- Otro esquema usa 50 mg cada 8 hs. el día de la cirugía, 25 mg cada 8hs. el día posterior a la misma y sólo 25 mg el día segundo posquirúrgico a las 8 hs. (HUNT Y COL JCEM 2002 Jun:87(6), 2745-50). Estos autores se manejan con niveles de cortisol basales tempranamente poscirugía (día 3 ó 5) para definir continuar con tto.

4- Equivalencias:

Droga	**Dosis**	**Retención Na**	**Duración accion**
Hidrotisona	20 mg	1	Corta: 8 hs.
Meprednisona	4 mg	0,8	Intermedia: 12-36 hs.
Prednisona	5 mg	0,8	Intermedia
metilprednisolona	5mg	0,8	Intermedia
dexametasona	0,75	0	Larga: 36-72 hs.
betametasona	0,75	0	Larga

5- Drogas

Hidrocortisona 10 mg=	hidrotisona: 10 mg por comp. Dosis: 20-30 mg cada 8-12 hs
Hidrocortisona 100 mg=	solucortril 100 (amp)
Meprednisona=	deltisona B 4 mg/ 8 mg (compr)
Prednisona=	meticorten 5-50 mg (compr)
Metilprednisolona=	solumedrol 500-1000 (inyectable)
	cortisel 500–1000 (inyectable)
Dexametasona=	decadron compr de 0,5 mg
	duodecadron inyectable 4-8 y 20 mg
Betametasona:	corteroid
Daflazacort:	azacortid 6 mg

6- Esquema de Stress:

Los pacientes con déficit comprobado deben tener una identificación que diga: " insufieciencia adrenal" recibe hidrocortisona.
Stress menores: infecciones respiratorias, urinarias, bronquitis, extracción dentaria, fiebre de origen desconocido, etc se debe duplicar o triplicar la dosis del corticoide. (usar via parenteral si hay náuseas, vómitos y/o diarrea).

Stress mayores: cirugía mayor, neumonías que requieran internacion, traumatismo de cráneo, etc. usar esquema de stress: hidrotisona 100 mg en bolo + 200 a 300 a pasar en 24 hs, luego se va disminuyendo a la mitad diariamente, según evolucion del paciente y si no hay complicaciones. Terminar con dosis habitual oral de 20-30 mg/día.

Síntomas indicativos de ISA: hipotensión, nauseas, vómitos, fiebre, shock, hipoglucemia, hiponatremia, hipotensión ortostática.