Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol 40 • No. 4
Copyright © 2003 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo

TRABAJO ORIGINAL

Perspectivas de la terapia génica en tumores tiroideos.

"Scope of Gene Therapy in Thyroid Cancer".

Pitoia, F.; Niepomniszcze, H.; Bruno, O.D.

Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Resumen

La terapia génica puede ser definida como la modalidad terapéutica en la cual se introduce material genético dentro de una célula para modificar su función. Las enfermedades que resultan de la herencia de un único gen mutado son las que presentan mayores posibilidades de ser tratadas con terapia génica. Sin embargo, el cáncer parece ser originado por una acumulación de varias alteraciones genéticas, por lo que el reemplazo de todos los genes alterados parece ser una tarea desalentadora. Se han explorado hasta el momento varias alternativas de terapia génica en el cáncer tiroideo. La mayoría de estas estrategias están dirigidas a la introducción de genes para incrementar las terapias ya existentes. En este artículo, revisamos los diferentes vectores usados para el transporte de genes y las estrategias investigadas hasta el momento, in vitro e in vivo, para el tratamiento de los tumores tiroideos malignos. Aunque la terapia génica se encuentra todavía en etapa experimental, durante los últimos años se ha observado un avance significativo que demuestra un beneficio de esta terapia aplicada a una variedad de neoplasias, que podría incluir a los carcinomas tiroideos.

Abstract

Gene therapy may be defined as a treatment modality in which genetic material is introduced into cells to modify cellular function. Diseases that result from inheritance of a single functionally defective gene, present the most logical target for gene therapy. However, cancer results from an accumulation of several genetic alterations. Accordingly, replacement of all defective genes to treat cancer is a daunting task.

Several alternatives have been explored for thyroid cancer gene therapy. Most of these strategies involve introduction of genes to augment existing therapies. In this article, we review the different vehicles used for delivery of genes and (Table 1) current thyroid cancer gene therapy strategies (Table 2), including: 1) Corrective cancer gene therapy: a) introduction of tumor supresor gene p53 [11-13], b) re-expresion of NIS in anaplastic thyroid cancer [15-19] and c) inactivation of c-myc oncogene by antisense therapy [30]; 2) "Suicide" gene therapy

Dirección Postal: Dr Oscar D. Bruno. Córdoba 2351 5to Piso (Ciudad Autónoma de Buenos Aires).
Teléfono: 59508830 - e-mail: divendhcli@intramed.net
Palabras clave: ITerapia génica; Cáncer tiroideo; Vector viral.
Key words: Gene therapy ; Thyroid cancer; Viral vehicle.

(Figure 1) [15-19]; 3) Immunomodulating gene therapy: a) with IL-2 [20-22], b) active immunization with calcitonine [29], and 4) introduction of genes with dominant negative mutations like RET protooncogene [32].

Notwithstanding the disappointing preliminary results, thyroid cancer gene therapy has become an established concept in medicine. Future success of gene therapy for thyroid tumors will rely on the progress of basic science and discovery of new disease related genes.

Introducción

El cáncer es, básicamente, una enfermedad de los genes. La pérdida, mutación o alteración de genes que codifican moléculas involucradas en la regulación del crecimiento y diferenciación es el hecho inicial que determina el desarrollo de una gran parte de las neoplasias. Ejemplos de esto lo constituyen la activación de genes promotores del crecimiento, protooncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores. Hay componentes hereditarios que afectan de diversas formas según el tipo de neoplasia. De todas maneras, la mayoría de las mutaciones relacionadas con el cáncer son somáticas, es decir, exclusivas de uno o más tejidos, sin afectar a la línea germinal. Por lo tanto, ciertos factores ambientales como carcinógenos químicos o radiaciones pueden ejercer su influencia. También se ha establecido que, en la mayoría de los casos, el cáncer es una enfermedad multigénica y que, más de un gen debe estar alterado para que se produzca la transformación maligna y se establezca un crecimiento invasivo.

La terapia génica puede definirse como la modalidad terapéutica en la cual el material genético es introducido dentro de las células para modificar la función de la misma. Las enfermedades que resultan de la herencia de un solo gen mutado, teóricamente, presentan la mayor posibilidad para una terapia génica exitosa. Pero el cáncer resulta de una acumulación de mutaciones. Algunas pueden ser heredadas en la línea germinal y otras son adquiridas en oncogenes y genes supresores tumorales. De todas maneras, todavía no han sido identificadas todas las alteraciones genéticas responsables en el desarrollo de las neoplasias, por lo tanto el reemplazo de los genes alterados para tratar al cáncer parece ser una tarea desalentadora, por el momento.

Vectores virales

Considerando las estrategias actuales en la terapia génica, en la mayoría de los casos se utilizan virus modificados a los cuales se les suprime la capacidad infectante para que actúen como vectores transportando un determinado material genético dentro de la célula que posee una mutación específica. Estos enfoques están basados en estudios sobre modelos in vitro o modelos animales. Aunque la mayoría se encuentra en fase pre-clínica, algunos ya se emplean en ensayos clínicos. Los virus más comúnmente utilizados son el Adenovirus (AV), algunos retrovirus (incluyendo el HIV), y el virus Herpes Simplex- Timidina kinasa, entre otros. En la Tabla I se describen los diferentes vehículos con las ventajas y desventajas relativas de cada sistema.

Los virus herpes poseen varias propiedades biológicas interesantes, incluyendo la capacidad de causar una variedad de infecciones clínicas, permanecer latentes en tejidos específicos y de ser reactivados en el sitio de infección original. Hay más de 80 miembros de la familia herpes virus que incluyen el virus herpes simples tipo 1 (VHS-1), tipo 2 (VHS-2) y varicela-zoster. La mayoría de los vectores para terapia génica han sido desarrollado de cadenas de VHS-1 [1].

Una de las propiedades de estos virus que los hace útiles para la terapia génica es la expresión de la enzima timidina kinasa (TK). Esta enzima monofosforila a la prodroga ganciclovir (GCV), que luego continúa siendo monofosforilada por las enzimas celulares a GCV trifosfato, el metabolito activo que inhibe la síntesis de ADN [2]. El GCV es una prodroga no tóxica para las células de los mamíferos, a menos que estas expresen al gen TK del VHS-1. La transfección de genes “suicidas” VHS1-TK dentro de las células tumorales seguido por el tratamiento con esta prodroga, es otra de las estrategias usadas para

Tabla I: Vectores virales para la terapia génica tumoral.

Vector (tamaño)	Ventajas	Desventajas
Retrovirus (10 kb)	genoma pequeño integración estable transferencia génica eficiente no tóxica para las células infecta células en división	requiere células en división transfiere solo secuencias pequeñas bajos títulos expresión transitoria mutagenesis tras inserción integración aleatoria labilidad *in vivo*
Adenovirus (36 kb)	títulos virales elevados transferencia génica muy eficiente no tóxica para las células infecta células en división y células que no se dividen	expresión transitoria transfiere solo secuencias pequeñas inmunogénica
Virus adeno-Asociados (5 kb)	genoma pequeño se integra en el cromosoma 19 trasferencia génica eficiente infecta células en división y células que no se dividen	transfiere solo secuencias pequeñas bajos títulos seguridad?
Poxvirus (vaccinia) (187 kb)	expresión génica transitoria transferencia y expresión génica altamente eficiente	muy inmunogénico segura en pacientes inmunosuprimidos
Virus herpes Simplex (152 kb)	infecta células en división y células que no se dividen neurotrófico altos títulos virales transgen de gran tamaño potencial para expresión prolongada	toxicidad relacionada a infecciones líticas seguridad?
Liposomas	sintéticos tamaño no limitado	ineficiencia en la transferencia
ADN “desnudo”	expresión transitoria Poca experiencia	ineficiencia en la transferencia

el tratamiento de tumores endocrinos.

El VHS-1 expresa a la enzima TK durante su ciclo replicativo y permite la actividad antitumoral tras la adición de GCV. Esta terapia "suicida" tiene otra característica que la convierte en una opción interesante al momento de elegir un vector y es el hecho del denominado "efecto espectador" (bystander effect) [3], por el cual aún las células tumorales vecinas que no fueron transfectadas con el virus mueren tras la administración del GCV. La exposición de las células huésped a esta droga conduce a su muerte y el transporte de los metabolitos tóxicos de la prodroga a través de las uniones estrechas, resulta en la muerte de células adyacentes mediada por el "efecto espectador". En la Figura 1 se observa una explicación de este efecto luego de una transfección en células de glioma.

Por otro lado, la clave para lograr una terapia génica "suicida" exitosa es restringir la expresión del gen a determinadas poblaciones celulares a través del uso de promotores específicos, como veremos mas adelante. Esto es muy importante, ya sea, en el tratamiento de una enfermedad sistémica, como por ejemplo el cáncer metastático, y en el tratamiento local, evitando la expresión de la enzima TK al mínimo en las células no tumorales. Varios tipos específicos celulares se han explorado usando este enfoque, incluyendo el uso de antígeno carcinoembrionario para el cáncer de colon [4], el antígeno prostático específico para el cáncer de próstata [5], el DF3/MUC1 en el carcinoma de mama [6], la scc/11Bhidroxilasa en carcinoma adrenal [7], y el promotor de Tiroglobulina (Tg) en el cáncer tiroideo [8]. Todas estas propiedades biológicas del VHS1-TK, así como el potencial para poder planear distintos enfoques según el tipo tumoral, hacen de este virus un vector ideal para la terapia génica.

Empleo de terapia génica en el cáncer de tiroides

Se han utilizado con éxito, diferentes estrategias para lograr un efecto antitumoral tiroideo. En la Tabla II se describen estas modalidades terapéuticas.

- Reemplazo del gen supresor de tumor p53:

El p53 es una proteína que, en condiciones normales, actúa como un supresor tumoral. Se trata de un factor de transcripción que "vigila" la integridad del genoma. Si el ADN genómico sufre mutaciones, por ejemplo, por efecto de radiaciones ionizantes, agentes quimioterápicos o hipoxia, el p53 detiene el ciclo celular para permitir la reparación del ADN dañado. Si el daño es demasiado severo y las alteraciones del ADN no son posibles de resolver, el p53 induce a la apoptosis para erradicar a la o las células con alteraciones genómicas para prevenir su proliferación. El p53 es la proteína más frecuentemente afectada en las neoplasias humanas (en casi el 40% de los tumores). Habitualmente un alelo presenta una deleción y el otro se encuentra mutado, lo que contribuye a la progresión tumoral con malignidad creciente y disminución en la diferenciación. Esto es aplicable también para el cáncer tiroideo. Este factor de transcripción se encuentra intacto en la glándula tiroides normal, en las enfermedades tiroideas benignas o en los carcinomas diferenciados pero hay una alta prevalencia de mutaciones del p53 en los tumores tiroideos indiferenciados, casi del 80% para carcinomas anaplásicos [9] y en cerca del 40% para carcinomas foliculares variedad insular [10]. Las mutaciones del p53 parecen ser un evento tardío en los carcinomas tiroideos. Este rol preponderante en la patogénesis de los tumores tiroideos lo ha transformado en un blanco ideal para la terapia génica. En 2 estudios, en los cuales se usaron líneas de carcinoma tiroideo

Tabla II: Estrategias usadas para la terapia génica en tumores tiroideos.

1. Terapia génica correctiva
a. Introducción de genes supresores tumorales *(p53)*
b. Re-expresión de genes *(NIS)*
c. Terapia antisense *(c-myc)*
2. Terapia génica "suicida" *(VHS1-TK)*
3. Terapia génica inmunomoduladora
a. Interleuquina 2 *(IL-2)*
b. Inmunización genética *(ADN plasmídico desnudo)*
4. Genes con mutaciones con efecto dominante negativo *(protooncogen RET)*

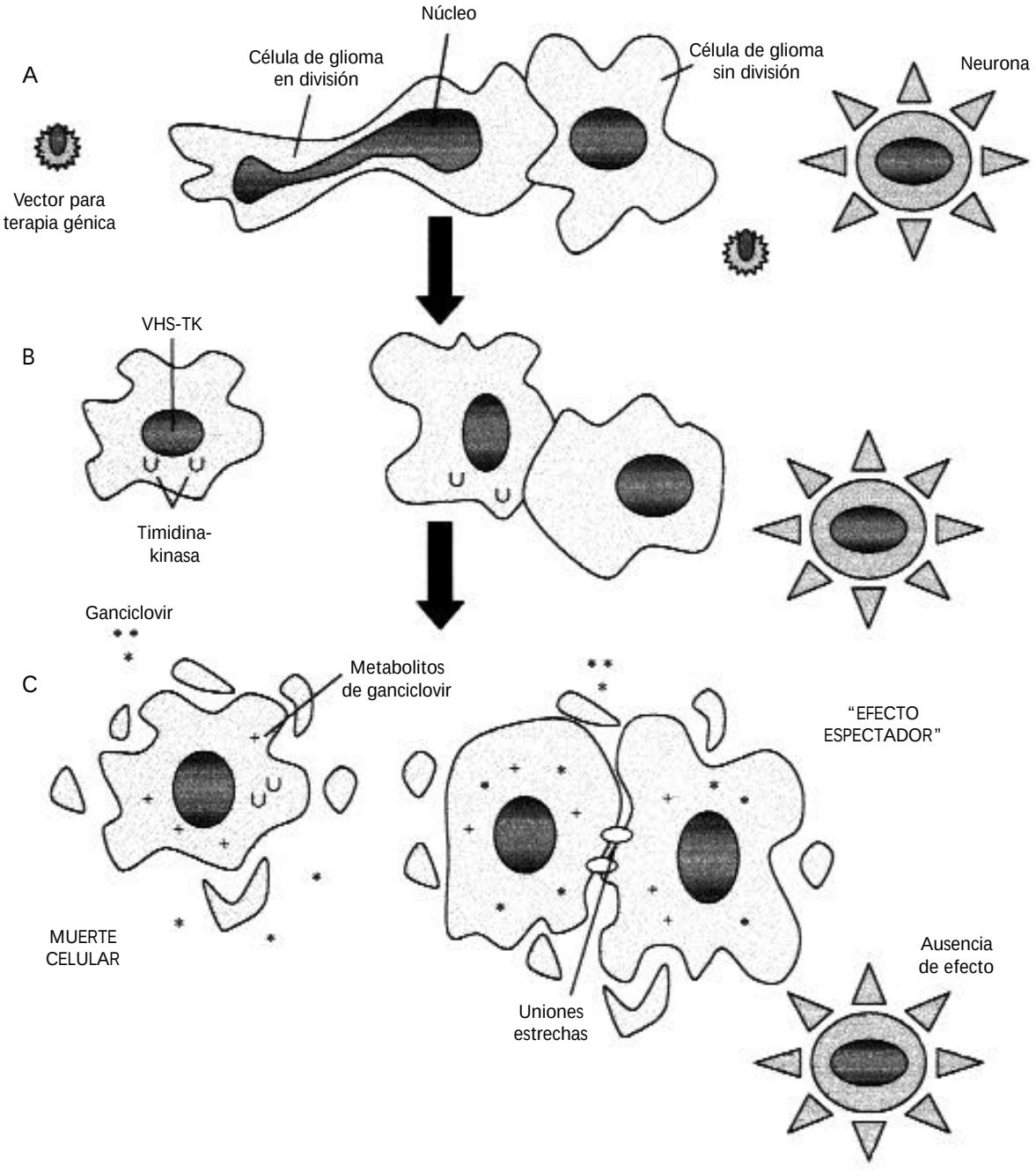


Figura 1: Terapia génica "suicida". **(A)** Las células tumorales son trasducidas con un vector que transporta al gen de la timidina kinasa del virus herpes simplex (VHS-TK). **(B)** La expresión trangénica en las células afectadas resulta en la síntesis de la enzima timidina kinasa, una kinasa exógena con alta afinidad para la droga ganciclovir. **(C)** La exposición de las células huéspedes al ganciclovir conduce a la fosforilación de la droga, dando origen a varios metabolitos tóxicos en las células que expresan el gen VHS-TK, determinando la muerte celular. El transporte de los metabolitos fosforilados tóxicos a través de las uniones estrechas conduce a la muerte celular de las células adyacentes por el efecto "espectador". *Adaptado de Cusack JC et al. Surg Oncol Clin of North Am 7: 452. 1998*

con mutaciones del p53, se demostró que la re-introducción del gen normal (wild type) del p53 causó un fenotipo más diferenciado. En estos trabajos se puso en evidencia el incremento de la expresión de marcadores específicos de diferenciación como la tiroperoxidasa, la Tg y el receptor de TSH, todo esto asociado a una inhibición en la proliferación celular [11-12].

De acuerdo a lo que se sabe con respecto a la función del p53, su re-expresión en un tumor p53 deficiente podría incrementar la sensibilidad a la radiación o a la quimioterapia. Narimatsu y col. [13] no detectaron un efecto sensibilizante a los quimioterápicos cisplatino, 5-fluoruracilo y doxorrubicina luego de transfectar una línea de carcinoma anaplásico con el gen normal del p53. Sin embargo, Nagayama y col. [14] posteriormente evaluaron la eficacia terapéutica de la transfección mediada por Adenovirus (AV) del gen p53 en líneas de carcinoma anaplásico con mutaciones del p53 y observaron que la re-expresión del p53 condujo a la muerte celular por apoptosis. Los estudios in vivo (realizando xenotransplante de células tumorales a ratones), demostraron un aumento de la muerte celular tras la administración de doxorrubicina (4 mg/kg, 3 veces por semana). Estos estudios indican que esta estrategia parece ser un arma eficaz dentro de las opciones disponibles para terapia génica de estos tumores, particularmente cuando se combina con quimioterapia.

- Terapia génica "suicida":

Nishihara y col [15] transfectaron 2 líneas celulares de carcinoma tiroideo (WRO y FRO) con el Virus Herpes Simplex- Timidina kinasa (VHS1-TK) bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV), usando un vector retroviral y observaron una disminución, tiempo y dosis dependiente, de la sobrevida celular luego del tratamiento con GCV, asociada a un incremento en la apoptosis. Las dosis bajas de GCV no produjeron daño por sí mismas, pero resultaron en una sensibilización frente a las radiaciones ionizantes.

Para minimizar los efectos en otros órganos, la actividad enzimática TK debería, como analizamos previamente, estar circunscripta a los tejidos blanco. Esto se podría lograr realizando la inyección a nivel intratumoral, pero esta estrategia excluiría a las metástasis diseminadas del efecto citotóxico. Braiden y col. [16] usaron un retrovirus recombinante que transportaba a la TK bajo el control del promotor de la Tg. Con este vector, ellos transfectaron a la línea diferenciada de tirocitos FRTL-5, a la línea celular maligna derivada de éstas, FRTC, y a la línea de carcinoma anaplásico FRO. Detectaron un incremento 130 y 160 veces mayor con respecto a la sensibilidad al GCV y, 4 y 27 veces mayor, tras el agregado o la ausencia de TSH en las líneas celulares FRTL-5 y FRTC, respectivamente. Estas 2 líneas expresaban Tg, pero en el caso de la línea FRO que no lo hace habitualmente, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de sobrevida celular entre las que fueron transfectadas y las que no recibieron la transfección.

Nagayama y col. [17] utilizaron el sistema denominado Cre-loxP, logrando incrementar la actividad del promotor de la Tg. Construyeron AV recombinantes con el gen de la TK del VHS1 bajo el control del promotor de la Tg. Por lo tanto Cre activaba la transcripción del gen VHS1-TK solamente en las líneas celulares que expresaban Tg (FRTL-5 y FRTC). Esto resultó en un efecto citotóxico 5 a 10 veces mayor, luego del agregado de GCV, in vitro, en comparación con otra construcción que contenía un AV recombinante con el gen VHS1-TK fusionado al promotor de Tg.

Obviamente, este enfoque está limitado a aquellos cánceres que todavía mantienen la expresión de la Tg, (la mayor parte de los cánceres tiroideos, ya que la Tg es usada como un marcador sensible, aún en casos avanzados). De todas maneras, hay que considerar que la desdiferenciación coincide generalmente con una disminución en la expresión de factores de transcripción específicos tiroideos y esto reduciría la eficiencia de la expresión de la Tg y de cualquier transgénico controlado por el promotor de la Tg.

Zhang y De Groot [18] usaron esta estrategia "suicida" en líneas celulares de carcinoma medular con resultados poco satisfactorios. Ellos relacionan esta falta de respuesta con esta modalidad terapéutica con la ausencia de efecto "espectador" debido a la escasa presencia de uniones estrechas presentes en las células del carcinoma medular.

Recientemente, estos mismos autores [19] utilizaron

un enfoque similar para el tratamiento in vivo e in vitro de un carcinoma de células de Hurthle. En esta oportunidad un AV que traducía el gen de la TK fue transfectado a tumores de células de Hurthle bajo el control del promotor de la Tg murina. Posteriormente agregaron GCV. Luego de este tratamiento in vitro, el 70% de las células transfectadas fueron destruídas. La toxicidad in vivo de esta modalidad fue evaluada en un ratón trangénico con un tumor de células de Hurthle. Luego de la transfección y el agregado de GCV, estos ratones desarrollaron una elevación de transaminasas acompañado de una infiltración linfocitaria hepática con necrosis celular. Luego de la inyección intratumoral, 15 de 17 ratones estabilizaron el crecimiento tumoral y en 2 el tumor desapareció. Estos datos confirman que este enfoque terapéutico fue efectivo y los resultados apoyan su aplicación futura en humanos.

- Inmunoterapia: IL-2 en tumores tiroideos:

Aunque los tumores expresan antígenos que pueden desencadenar una respuesta

inmune, a menudo evaden la vigilancia del sistema inmune por una disminución en la expresión de antígenos de histocompatibilidad clase I y II. Además, esta respuesta puede estar deprimida como consecuencia de ciertos productos liberados por el mismo tumor. La IL-2 actúa sobre la proliferación y diferenciación de linfocitos NK, CD4 y linfocitos T citotóxicos, y la administración sistémica de IL-2 produce inmunidad antitumoral en modelos animales. Sin embargo, la dosis necesaria para lograr este efecto terapéutico, frecuentemente, causa efectos indeseables en el ser humano. La administración intratumoral de la citokina podría proveer concentraciones más altas y evitar este problema. Alternativamente, el gen de la IL-2 puede ser introducido por medio de terapia génica, dentro de las células tumorales.

En 2 publicaciones de Zhang y De Groot [20,21], se utilizó este enfoque como una opción para el tratamiento del carcinoma medular de tiroides. Ellos usaron un AV que transportaba al gen murino de la IL-2 (IL-2m) bajo el control del promotor del CMV humano. Estas líneas celulares transfectadas in vitro secretaron cantidades elevadas de IL-2m. Al inyectar estas líneas celulares por xenotransplante a ratones con carcinoma medular de tiroides, se observó una importante disminución en el crecimiento tumoral. La reinyección de las líneas parentales en animales libres de tumor, luego de 60 días, no mostró producción tumoral, revelando una inmunidad a largo plazo contra las células tumorales. Cuando el AV codificante de IL-2 se inyectó en tumores previamente generados, se observó una regresión en el 69 % de los tumores "pequeños" (menores a 30 mm^3) y una estabilización de los "grandes" tumores (mayores a 30 mm^3). Para evaluar la seguridad del procedimiento, el AV se administró vía endovenosa para monitorizar los efectos en otros tejidos. La diseminación hacia el hígado determinó una infiltración linfocítica a nivel sinusoidal, pero esto no afectó los niveles enzimáticos de GOT y GPT. Dos de 12 animales mostraron signos de necrosis celular en el bazo pero no hubo alteraciones a nivel pulmonar ni renal.

Por otro lado, Barzon y col. [22], desarrollaron un vector retroviral que expresaba 2 genes terapéuticos: TK del VHS1 e IL2, y evaluaron sus efectos en diferentes líneas tumorales de cáncer tiroideo y en ratones que presentaban tumores xenotransplantados. La expresión de los genes fue superior en los tumores diferenciados y el agregado de GCV condujo a una erradicación completa de los tumores anaplásicos y a una disminución en el 80% del tamaño de los tumores diferenciados. El análisis histológico demostró un infiltrado inflamatorio con necrosis tumoral. Este trabajo demostró la efectividad de la combinación de dos tipos diferentes de terapia génica (inmunomoduladora y suicida).

- Terapia génica usando el simporter de ioduro/sodio:

Luego de clonar el simporter de Na^+/ I^- (NIS) [23] se introdujo una nueva clave para dilucidar la patogénesis de las enfermedades tiroideas, incluyendo la del cáncer de tiroides. Por ejemplo, la reducción en la expresión y funcionalidad de esta proteína puede contribuir a la falla en la terapia con radioiodo, debido a una carencia en la acumulación de I^{131} en los carcinomas tiroideos avanzados [24].

Shimura y col. [25] investigaron si la reexpresión de este transportador en células poco diferenciadas conduciría a la recaptación de I^{131} en tumores

tiroideos. Ellos transfectaron una línea celular de carcinoma tiroideo de rata (FRT-Te) con el NIS intacto y posteriormente realizaron un xenotransplante a nivel subcutáneo en ratas Fisher. Los tumores resultantes, concentraron el radioiodo 27 veces más que las líneas parentales. De todas maneras, no se observó un efecto inhibitorio luego del tratamiento con radioiodo, ya que el volumen tumoral no sufrió variaciones 3 semanas luego de esta terapia.

También se ha enfatizado en el uso de este simporter para el tratamiento de otros tumores, es decir, expresión de NIS en líneas celulares que habitualmente no lo hacen, para poder usar el radioiodo como otra opción terapéutica. Mandel y col. [26] transfectaron al NIS con el uso de un vector retroviral en líneas celulares humanas de melanoma, hepatocarcinoma, carcinoma de colon y adenocarcinoma de ovario. Las células acumularon ioduro, ya sea en cultivo o en tumores que fueron generados por xenotransplante. Además, demostraron un aumento en la muerte celular luego del tratamiento con radioiodo en los cultivos, pero no se evaluó la respuesta en los xenotransplantes.

Debería agregarse que una publicación reciente sugiere que la pérdida de la captación de radioiodo en los carcinomas tiroideos podría ser secundaria a una disminución en la transcripción, causada por una metilación aberrante del gen NIS [27]. Las muestras tumorales no mostraron patentes específicas de metilación en correlación con una deficiencia en la expresión del ARNm del NIS, pero el tratamiento de 7 líneas de carcinoma tiroideo con 5-azacitidina o butirato de sodio, considerados como agentes diferenciantes, restauró la expresión del ARNm del NIS en 4 y aumentó la captación de I^{131} en dos de ellas y esto fue debido a una desmetilación del gen NIS. Entonces, la expresión del NIS y su actividad podrían ser restauradas manipulando la metilación del ADN, al menos en el contexto del cáncer tiroideo, como otro enfoque terapéutico.

- Inmunización genética: calcitonina

Se conoce que es posible generar una respuesta inmune por medio de la inyección de ADN plasmídico desnudo [28]. En el cáncer medular de tiroides, el marcador tumoral calcitonina puede representar un blanco interesante para la inmunoterapia. Haupt y col. [29] desarrollaron una vacuna plasmídica que codificaba la preprocalcitonina bajo el control del promotor del CMV. Ellos observaron una respuesta inmune en 4 de 5 animales con carcinoma medular luego de su administración, y la co-inyección de factores estimulantes de la colonia granulocítica-macrofágica, incrementó esta respuesta específica.

- Terapia antisense:

El protooncogen c-myc codifica para una proteína nuclear que actúa como un factor de transcripción que produce un estímulo mitogénico. Este gen se encuentra activado de manera constitutiva en una variedad de neoplasias [30].

En el cáncer de tiroides, la sobreexpresión de c-myc parece estar relacionada con un pronóstico desfavorable y se ha encontrado un incremento de la expresión del ARNm de c-myc en 7 líneas celulares de neoplasias tiroideas humanas comparado con líneas de células tiroideas normales [31]. Estos autores bloquearon la expresión proteica de c-myc con oligonucleótidos antisense contra la región de iniciación de traslación del ARNm y observaron una disminución significativa en la tasa de crecimiento de estas líneas celulares de cáncer tiroideo. Aunque estos experimentos se hicieron primariamente para clarificar el rol biológico de c-myc, también pueden ser considerados dentro de los enfoques actuales para la terapia génica del cáncer tiroideo.

- Terapia génica usando genes con efecto dominante negativo

Drosten y col. [32] usaron esta modalidad in vitro, en una línea celular de carcinoma medular causado por mutaciones activantes del protooncogen RET. Para investigar los efectos que tendría una transfección usando un gen con una mutación dominante negativa, estos autores transfectaron este gen por medio de un AV a una línea celular de carcinoma medular. Se observó una potente inhibición de la viabilidad celular, probablemente por un efecto combinado de inhibición del crecimiento e inducción de la apoptosis. Este podría ser otro enfoque terapéutico interesante cuando se encuentren mutaciones activantes.

Conclusiones

Desde que la terapia génica fue usada por primera vez en 1990 para la deficiencia de adenosina deaminasa, más de 160 estudios han sido registrados por el National Institutes of Health de Washington, USA, pero el éxito actual de estos procedimientos parece ser un poco desalentador. De todas maneras, la investigación en este campo está avanzando rápidamente. Los proyectos actuales están enfocados en desarrollar adyuvantes cada vez más eficientes, virales o no virales, y en modificar a los antígenos virales para lograr una infección más eficiente o incrementar la especificidad en la transducción de genes exógenos utilizando promotores específicos. Otras perspectivas están apareciendo, considerando la posibilidad de utilizar dos modalidades combinadas para lograr mayor efectividad.

Actualmente, el tratamiento del cáncer de tiroides continúa estando basado en el enfoque quirúrgico inicial y la admnistración de radioyodo en los casos de tumores bien diferenciados. Sin embargo, están desarrollándose múltiples opciones de terapia génica con un potencial creciente y es muy probable, que en no más de 5 a 10 años, los pacientes puedan tener los beneficios de esta nueva modalidad terapéutica que conlleva un cambio radical en lo que hasta el momento significa el tratamiento de los tumores tiroideos malignos.

Bibliografía

1. Cousack, J.; Tanabe, K. Cancer gene therapy. Surg Oncol Clin North Am. 421-469. 1998
2. Moolten, F.L.; Wells, J.M. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. J Natl Cancer Inst. 82: 297-300. 1990
3. Freeman, S.M.; Abboud, C.N.; Whartenby, K.A. The “bystander effect”: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. Cancer Res. 53: 5274-5283. 1993
4. Richar ds, C.A.; Austin, E.A.; Huber, B.E. Transcriptional regulatory sequences of carcinoembryonic antigen: identification and use with cytosine deaminase for tumor-specific gene therapy. Hum Gene Ther. 6:881–893. 1995
5. Pang, S.; Dannull, J.; Kaboo, R. y col. Identification of a positive regulatory element responsible for tissue-specific expression of prostate-specific antigen. Cancer Res. 57:495-499. 1997
6. Chen, L.; Chen, D.; Manome, Y. y col. Breast cancer selective gene expression and therapy mediated by recombinant adenoviruses containing the DF3/MUC1 promoter. J Clin Invest. 96:2775-2782. 1995
7. Chuman, Y.; Zhan, Z.; Fojo, T . Construction of Gene Therapy Vectors Targeting Adrenocortical Cells: Enhancement of Activity and Specificity with Agents Modulating the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Pathway. J Clin Endocrinol Metab. 85:253-262. 1999
8. Nagayama, Y.; Nishihara, E.; Iitaka, M. y col. Enhanced efficacy of transcriptionally targeted suicide gene/product therapy for thyroid carcinoma with the Cre-loxP system. Cancer Res. 59:3049-3052. 1999
9. Fagin, J.A.; Malsivo, K.; Karnakas, A. y col. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differenciated human thyroid carcinomas. J. Clin Investig. 91: 179-184.1993
10. Fagin, J.A.; Matsuo, K.; Karmakar, A. y col. High prevalence of p53 gene in poorly differenciated human thyroid carcinomas. J Clin Invest 91:179-184. 1993
11. Fagin, J.A.; Tang, S.H.; Zeki, K. y col. Reexpression of thyroid peroxidase in a derivative of an undifferenciated thyroid carcinoma cell line by introduction of wild-type p53. Cancer Res 56:765-777. 1996
12. Moretti, F.; Farsetti, A.; Soddin, S. y col. P53 re-expression inhibits proliferation and restores differentiation of human thyroid anaplastic carcinoma cells. Oncogene 14:729-740. 1997
13. Narimatsu, M.; Nagayama, Y.; Akino, K. y col. Therapeutic usefulness of wild-type p53 gene introduction in a p53-null anaplastic thyroid carcinoma cell line. J Clin Endocrin Metab 83:2516-2522. 1998

14. Nagayama, Y.; Yokoy, H.; Takedo, K. y col. Adenovirus-mediated tumor suppressor p53 gene therapy for anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo. J Clin Endocrin Metab 85:4081-4086.2000
15. Nishihara, E.; Nagayama, Y.; Mawatari, F. y col. Retrovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene trasduction renders human thyroid carcinoma cell lines sensitive to ganciclovir and radiation in vitro and in vivo. Endocrinology 138:4577-4583. 1997
16. Braiden, V.; Nagayama, Y.; Iitaka, M. y col. Retrovirus-mediated suicide gene/prodrug therapy targeting thyroid carcinoma using a thyroid-specific promoter. Endocrinology. 139:3996-3999. 1998
17. Nagayama, Y.; Nishihara, E.; Iitaka, M. y col. Enhanced efficacy of transcriptionally targeted suicide gene/prodrug therapy for thyroid carcinoma with the Cre-loxP system. Cancer Res. 59:3049-3052. 1999
18. Zhang, R.; De Groot, L. Gene therapy of established medullary thyroid carcinoma with herpes simplex viral thymidine kinase in a rat tumor model: Relationship of bystander effect and anti-tumor efficacy. Thyroid 10: 313-318. 2000
19. Zhang, R.; Straus, F.H.; DeGroot, L.J. Cell-specific viral gene therapy of a Hurthle cell tumor. J Clin Endocrinol Metab. 87:1407-14. 2002
20. Zhang, R.; Straus, F.H.; De Groot, L.J. Effective genetic therapy of established medullary thyroid carcinomas with murine interleukin-2:dissemination and citotoxicity studies in a rat tumor model. Endocrinology 140:2152-2158. 1999
21. Zhang, R.; Baunoch, D.; De Groot, L.J. Genetic immunotherapy for medullary thyroid carcinoma :destruction of tumors in mice by in vivo delivery of adenoviral vector transducing the murine IL-2 gene. Thyroid 8:1137-1146. 1998
22. Barzon, L.; Bonaguro, R.; Castagliuolo, I. y col. Gene therapy of thyroid cancer via retrovirally-driven combined expression of human interleukin-2 and herpes simplex virus thymidine kinase. Eur J Endocrinol. 148:73-80. 2003
23. Dai, G.; Levy, O.; Carrasco, N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. Nature 379: 458-460. 1996
24. Filetti, S.; Bidart, J.M.; Arturi, F. y col. Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. Europ J Endocrinol 141: 443-457. 1999
25. Shimura, H.; Haraguchi, K.; Miyazaki, A. y col. Iodide uptake and experimental 131-I therapy in transplanted undifferenciated thyroid cancer cells expressing the Na/I-symporter gene. Endocrinology 138:4493-4496. 1997
26. Mandell, R.B.; Mandell, L.Z.; Link, C.J. Jr. Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium symporter gene. Cancer Res. 59:661-668. 1999
27. Venkataraman, G.M.; Yatin, M.; Marcinek, R. y col. Restoration of iodide uptake in dedifferenciated thyroid carcinoma: relationship to human Na/I symporter gene methylation status. J Clin Endocrin Metab 84: 2449-2457. 1999
28. Kowalczyk, D.W.; Erlt, H.C. Immune responses to DNA vaccines. Cell and Mol L Sciences 55:751-770 1999
29. Haupt, K.; Siegel, F.; Lu, M. y col. Induction of a cellular and humoral immune response against the tumor associated calcitonin by genetic immunization. J of Endocrin Invest 22 (suppl) 4 (abstract). 1999
30. Weinberg, R.A. How cancer arises. Scientific American 271:62-75. 1996
31. Cerutti, J.; Trapasso, F.; Battaglia, C. y col. Block of c-myc expression by antisense oligonucleotides inhibits proliferation of human thyroid carcinoma cell lines. Clin Cancer Res 2: 234-241 (Abstract) 1997
32. Drosten, M.; Frilling, A.; Stiewe, T. y col. A new therapeutic approach in medullary thyroid cancer treatment: inhibition of oncogenic RET signaling by adenoviral vector-mediated expression of a dominant-negative RET mutant. Surgery 132:991-7; discussion 997. 2002

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol 40 • No. 4
Copyright © 2003 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo

TRABAJO ORIGINAL

17-Beta-Estradiol: comparación entre cuatr o equipos comerciales.

"17-Beta-Estradiol: comparative results between four different commercial kits".

Bioq. Dubicki, Bárbara *; Bioq. Andrada, Marta C. **; Bioq. Rocchiccioli, Cecilia **; Bioq. Kiener, O. **; Bioq. de Elías, R. **

(*) Laboratorio Privado de Radioinmunoanálisis, (**) Laboratorio Central Sanatorio Allende, Córdoba, Argentina

Resumen

Son numerosos los informes acerca de la comparación de métodos para medir Estradiol sérico, cuyos resultados concluyen en que hay grandes diferencias entre las concentraciones de la hormona. Por ello, el objetivo de este estudio fue correlacionar los valores de E2 sérico medido con cuatro equipos comerciales en pacientes sometidas a estimulación ovárica y encontrar alguna relación numérica entre los resultados. Los equipos comerciales utilizados, fueron: DPC, DSL, BYK, y ELECYS. Se encontró diferencia significativa entre las medias de los métodos, exceptuando la relación entre ELECYS- BYK. La concordancia fue mejor entre DPC-DSL (métodos RIA) y ELECYS-BYK (EQLIA vs RIA) habiendo resultado mala para ELECYS- DSL. Usando la regresión de Deming se calculó la relación numérica (RN) para siete niveles de E2 en un rango de 50- 1500 pg/ml y en todos los casos ésta RN entre EQLIA y RIA fue inversa al aumento en los valores de E2. La RN permite calcular valores de E2 para conocer cómo varían los resultados, con un equipo comercial comparado con otro a un determinado nivel de valor.

Abstract

Previous studies about comparison among methods to measure serum Estradiol (E2) report great differences between the concentrations of the hormone. So, the aim of this study was to correlate the values of serum E2 measured by four commercial kits in patients undergoing ovarian stimulation and to find some numerical relation among these results. The commercial kits were from DPC, DSL, BYK, and ELECYS. Significant differences among methods media has been found, except for the relation ELECYS- BYK. The concordance was better among DPC-DSL (RIA methods) and ELECYS-BYK (ECLIA vs RIA) and it was worse between ELECYS- DSL. Using Deming regression, was calculated the numerical relation (NR) for seven levels of E2 ranging of 50- 1500 pg/ml and in all cases the NR between ECLIA and RIA was inverse to the increasing of E2 values. The NR allow to calculate values of E2 to know how the result varies by one kit at any level, if it is compared with the same level of any other.

Dir ección Postal: Bioq. Bárbara Dubicki. Valencia 1486- Bo. Crisol - (5014) Córdoba - e-mail: bdubicki@ hotmail.com
Palabras clave: Estradiol, métodos, comparación, Regresion Deming.
Key words: Estradiol, Methods, Comparison, Deming Regression.

Introducción

El análisis del 17-Beta Estradiol (E_2), es útil para evaluar la función ovárica en general, monitorear el desarrollo de los folículos ováricos en pacientes que participan de programas de reproducción asistida y, dependiendo de la sensibilidad del ensayo, puede ser de utilidad diagnóstica en perimenopausia y pediatría [1,2,3].

Los esfuerzos actuales desde el punto de vista metodológico, son, para varios grupos de investigación, lograr cierta uniformidad en el significado de los resultados obtenidos por distintos métodos o equipos comerciales, tema que significa un verdadero problema a la hora de comparar valores de E_2, de muestras analizadas por laboratorios diferentes [4]. Este aspecto adquiere especial relevancia en el caso de programas de reproducción asistida en los que normalmente se realizan mediciones seriadas de la hormona, cuyos valores son indicativos del grado de crecimiento folicular, y se pueden usar para predecir el momento de la ovulación, alertar sobre la posibilidad de hiperestimulación ovárica o establecer la terapia a seguir. Los artículos científicos que se ocupan de comparar métodos de valoración del E_2, invariablemente señalan que en el caso de estas pacientes, se recomienda que sea siempre el mismo laboratorio el que procese las muestras en cada caso, ya que no siempre se pueden comparar sus valores con los obtenidos en otros.

Objetivo:

El objetivo de este trabajo, fue comparar algunos de los métodos que se usan localmente, establecer correlaciones entre ellos, y si fuera posible, obtener que relación se puede hallar entre los mismos.

Pacientes y Métodos

Pacientes:

Se realizó el análisis de 17-Beta estradiol a 25 muestras, provenientes de pacientes pertenecientes a programas de reproducción asistida, con régimen terapéutico de gonadotrofinas, en distintas etapas del ciclo de estimulación. El material recogido se conservó a -20ºC hasta el momento de su procesamiento,el cual se efectuó íntegramente, el mismo día de su descongelamiento y las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

Métodos:

Se utilizaron 4 inmunoensayos comerciales: tres de ellos fueron Radioinmunoanálisis (RIA) y el cuarto Electroquimioluminiscencia (EQLIA).

Los RIA utilizados fueron:

• Coat-a-Count Estradiol (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA),(**DPC**): ensayo manual en fase sólida con tubos recubiertos, usando un tiempo de incubación de 180' a temperatura ambiente. (No se usó el método alternativo rápido de 60' a 37ºC para no sacrificar sensibilidad a valores bajos). Su rango de trabajo es de 20 a 3.600 pg/ml (0,07-13,2 nmol/L) y el límite de detección declarado por el fabricante es de 8 pg/ml.

• DSL - 4400 Estradiol (Diagnostic Systems Laboratories, TEX, USA) (**DSL**) es un ensayo manual en fase líquida, con incubación de 30' a 37ºC. Su rango de trabajo es de 20 a 6.000 pg/ml (0,07- 22 nmol/L) y su límite de detección declarado es de 4,7 pg/ml.

• RIA - mat Estradiol (Byk - Sangtec Diagnóstica, Germany) (**BYK**) es un ensayo manual en fase sólida con tubo recubierto, y tiempo de incubación de 120' a 37ºC. Su rango de trabajo es de 13,6 a 4.080 pg/ml (0,05 - 15 nmol/L) y el límite de detección declarado es de 5 pg/ml.

El método de EQLIA usado fue: Estradiol Roche para analizador automático Elecys 2010 (**ELE**) que se basa en la emisión de fotones como resultado de una reacción redox (entre quelato de rutenio (trazador) y tripropilamina) sobre un electrodo, cuando se aplica una diferencia de potencial. Su rango de trabajo es de 10 a 4.600 pg/ml (0,037-17 nmol/l) y el límite de detección declarado es de 10 pg/ml.

Análisis Estadístico:

El análisis estadístico de los datos se realizó usando el test t apareado de comparación de medias entre métodos, (Software Excel de Windows), el test kappa de concordancia entre métodos y el análisis de regresión de Deming, usando el programa de computación EP_ Suite for Windows Versión 2.0 (módulo EP_ Suite 9-A: Method Comparison) de MarChem Associates, Inc, USA, creado según las

recomendaciones del NCCLS EP9-A (National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA,1995) [5].

La comparación entre los métodos se realizó tomando 2 de ellos como principales: entre los RIA se eligió a DPC por ser el más utilizado en general, y por ser citado más frecuentemente en trabajos de comparación de similar naturaleza a éste. Por otra parte, se intentó comparar los métodos de RIA con respecto a EQLIA tomando a éste último como segundo método principal.

Los grupos de comparación se establecieron de la siguiente manera: DPC vs BYK (15 muestras), DPC vs DSL (18 muestras), DPC vs ELECYS (20 muestras). ELECYS vs BYK (23 muestras), ELECYS vs DSL (25 muestras), ELECYS vs DPC (20 muestras). Se descartó los duplicados que tuvieron un coeficiente de variación mayor al 20%.

En el análisis de correlación se establecieron 3 niveles críticos de Estradiol: 100, 500 y 1000 pg/ml. Esta elección se fundamentó en la intención de abarcar 3 posibles grupos desde el punto de vista clínico: a) valores bajos, habitualmente encontrados en ciclos no ovulatorios, b) medios, asociados a picos ovulatorios, y c) altos, propios de pacientes con terapias inductoras de hiperestimulación ovárica.

Usando sueros de pacientes hiperestimuladas con gonadotrofinas exógenas, se obtuvo un rango amplio de valores, que permitieron hacer esta discriminación de niveles, ya que de otra forma, concentraciones de Estradiol mayores de 500 pg/ml no son factibles de obtener en los estudios rutinarios que se hacen a las pacientes en ciclos normales.

Resultados

Comparación entre las medias:

El método que mostró mayor variabilidad (superior al 20%) entre duplicados, fue BYK y ésta fue mínima con DSL.

Según el test de comparación entre medias apareadas, hubo diferencias significativas entre los métodos con excepción de ELE-BYK que muestran niveles similares (Tabla 1). DPC tiene valores menores que BYK y ELE y mayores que DSL. En general, los valores de ELE fueron mayores a los otros métodos con los que se comparó (Gráficos 1-5).

Métodos	n	Medias (pg/ml)	p
DPC-BYK	15	677-821	<0.005
DPC-DSL	18	629-463	<0.005
DPC-ELE	20	636-755	<0.005
ELE-BYK	23	644-638	>0.005
ELE-DSL	25	620-380	<0.005

Tabla 1: Diferencia entre medias.

Análisis de la concordancia entre métodos:

La mejor concordancia obtenida, fué entre DPC-DSL y ELE-BYK (valor ideal de K=1). Los métodos que tienen mala concordancia, son DPC-BYK y ELE-DSL (Tabla 2).

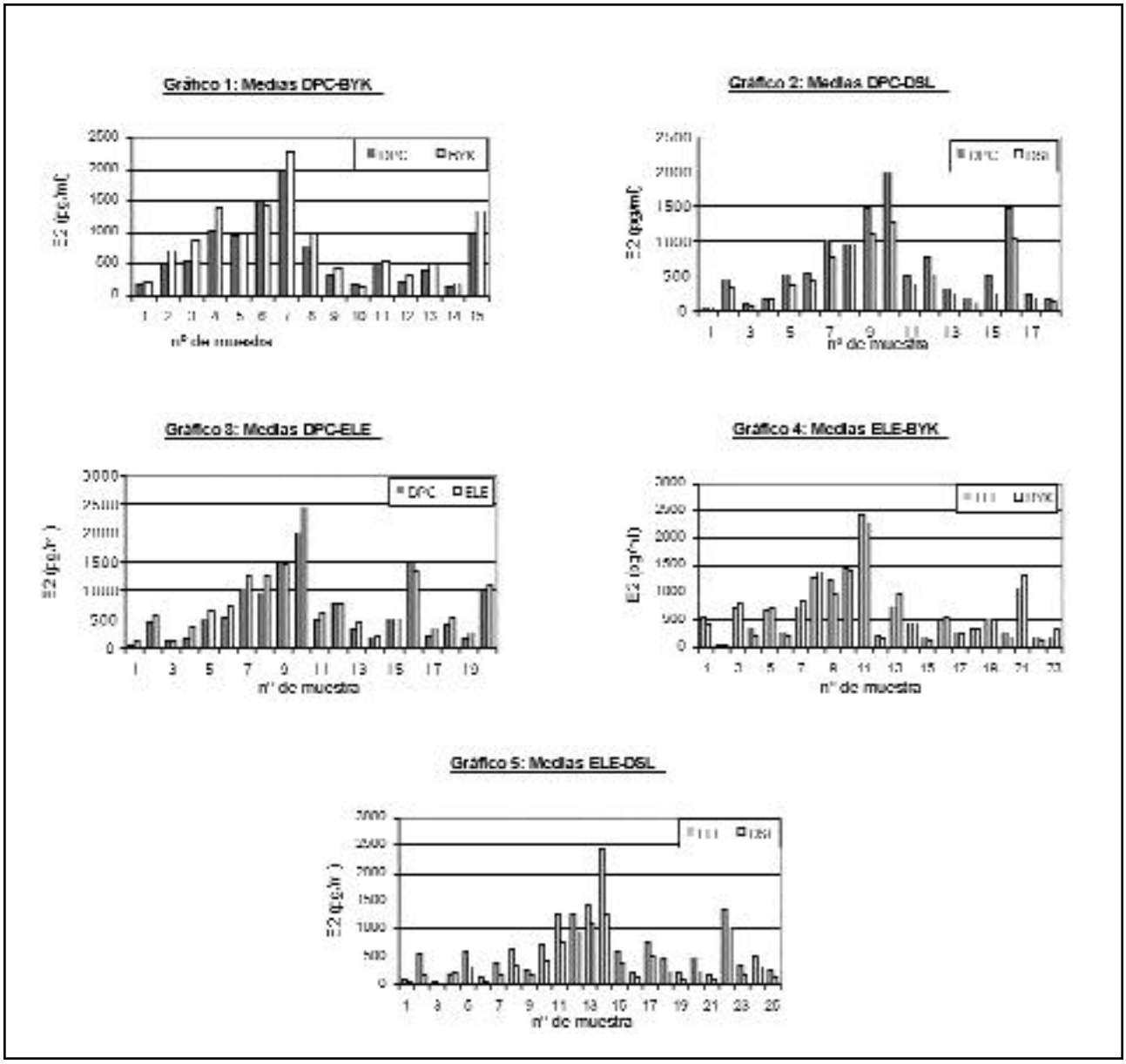
Como parte del análisis de regresión de Deming se obtuvo el bias (error proporcional) con su intervalo de confianza del 95% a 3 niveles críticos de DPC (Tabla 3) y ELE (Tabla 4).

El análisis del error proporcional que demuestra el bias, indica un comportamiento similar aunque de diferente magnitud, en los 3 métodos comparados. En todos, a medida que aumenta la concentración de Estradiol, aumenta el bias. A valores bajos, BYK guarda mayor similitud con DPC que DSL y ELE, mientras que a valores medios y altos, BYK y DSL muestran magnitudes absolutas similares, aunque con signo contrario, ya que DPC tiene valores

Métodos	n	Rango (pg/ml)	Indice *kappa* (±IC95%)
DPC-BYK	15	156,5-1991	0,33±0,34
DPC-DSL	15	55,5-1991	0,82±0,23
DPC-ELE	20	55,0-1991	0,53±0,25
ELE-BYK	23	67,0-2453	0,86±0,18
ELE-DSL	25	67,0-2453	0,28±0,29

Tabla 2: Concordancia entre métodos.

Gráficos 1-5: Medias correspondientes a los métodos comparados.



DPC (pg/ml)	BYK (pg/ml)	DSL (pg/ml)	ELECYS (pg/ml)
100	2,6 (-49.9 a 55,2)	-22,5 (-35,1 a -9,9)	64,1 (41,8 a 86,4)
500	120,1 (42,7 a 197,5)	-132,3 (-170,4 a -94,2)	119,1 (60,6 a 177,6)
1000	267,0 (74,9 a 459,1)	-269,6 (-354,3 a -184,9)	187,8 (58,1 a 317,5)

Tabla 3: Bias registrado (con el IC del 95%) entre las 3 comparaciones realizadas respecto a DPC.

ELE (pg/ml)	BYK (pg/ml)	DSL (pg/ml)	DPC (pg/ml)
100	-36,2 (-54,1 a -18,4)	-57,1 (-67,9 a -46,3)	-56,3 (-78,6 a -65,5)
500	-14,0 (-68,9 a -40,9)	-200,5 (-233,0 a -168,0)	-104,7 (-143,9 a -65,5)
1000	13,7 (-180,8 a 136,3)	-379,8 (-453,3 a -306,3)	-165,1 (-258,1 a -72,1)

Tabla 4: Bias registrado entre las 3 comparaciones realizadas respecto a ELECSYS (ELE).

menores que BYK y mayores a DSL (Tabla 1). En cuanto a ELE, si bien a valores bajos de DPC presenta mayor error, a medida que sus valores aumentan, el bias disminuye si se compara a valores absolutos con los demás métodos.

Si se analiza los valores absolutos del bias, se puede observar que el error varía en distinta proporción, según el valor de Estradiol considerado. Entre los 3 métodos comparados, BYK con ELE muestran menor bias, que varía en forma inversamente proporcional indicando mejor desempeño entre ambos métodos a medida que aumenta la concentración de Estradiol. Con DSL y DPC se observa un comportamiento opuesto, es decir, que su error aumenta con la concentración de E_2, rasgo especialmente notorio entre ELE y DSL, lo que indicaría una posibilidad muy escasa de comparación real entre ambos métodos.

El estudio de las pendientes en las Figs. 1 a 3 muestra que presentan diferencia estadísticamente significativa ($b \neq 0$). En cuanto a la ordenada al origen, todos los intervalos de confianza incluyen al 0, exceptuando ELE-DPC.

El estudio de las pendientes obtenidas en las Figs. 4 a 6 muestra que presentan diferencia estadísticamente significativa ($b \neq 0$) con excepción

Figura 1: Gráfico de Regresión entre BYK - DPC

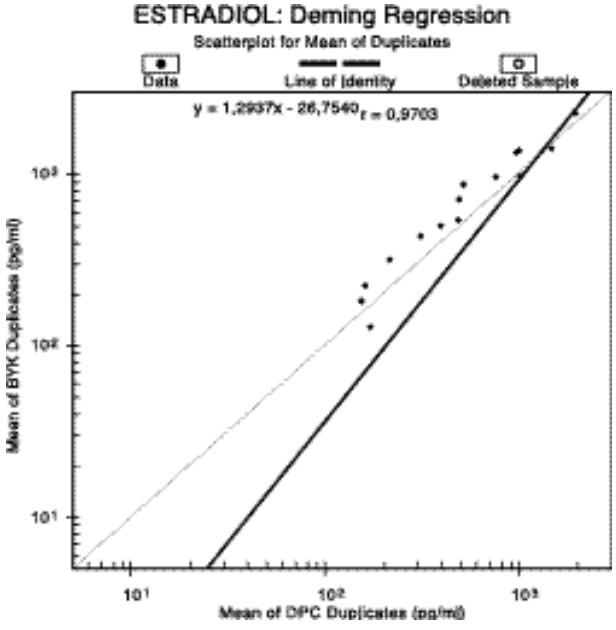


Figura 2: Gráfico de Regresión entre DSL - DPC

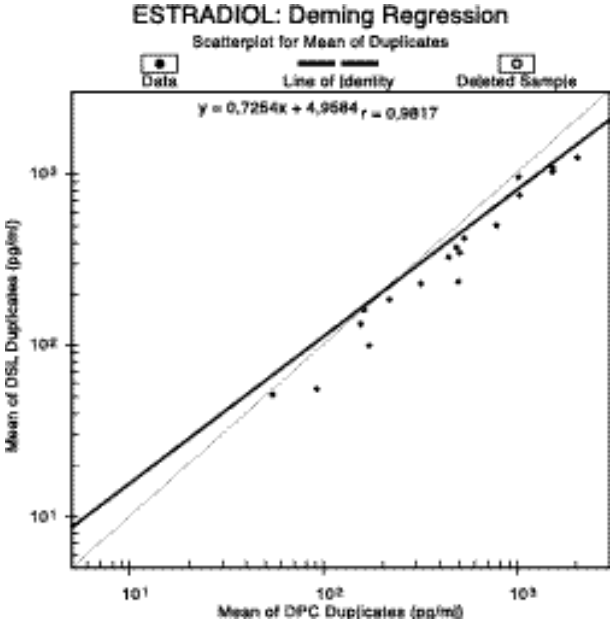


Figura 3: Gráfico de Regresión entre ELECYS - DPC

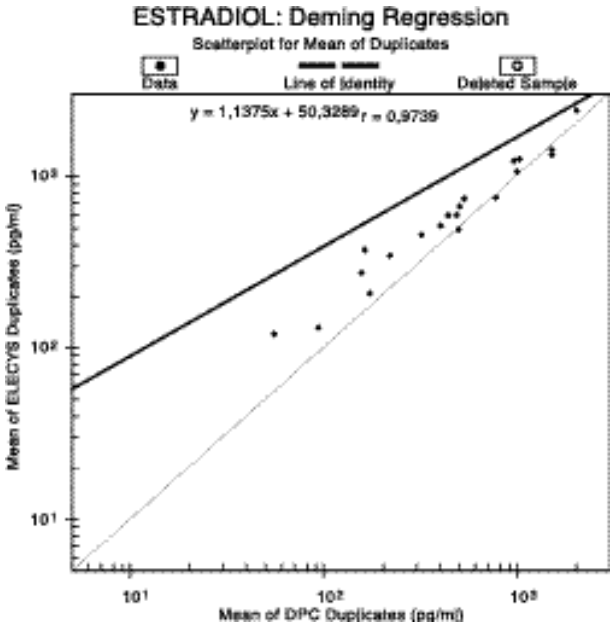


Figura 4: Gráfico de Regresión entre BYK - ELECYS

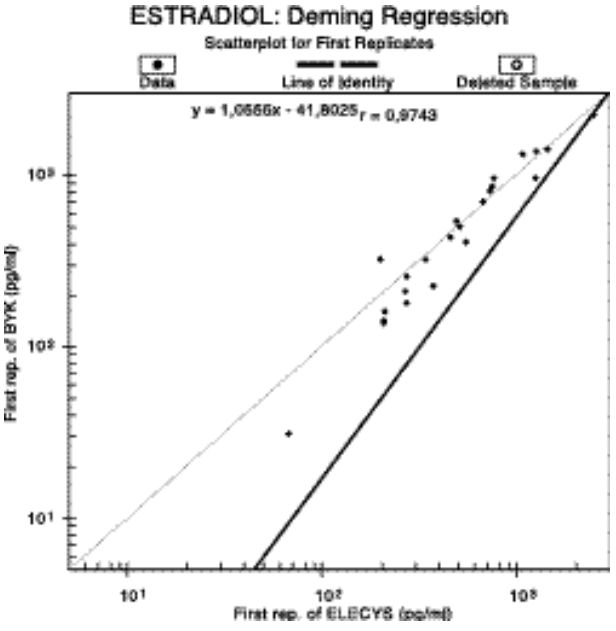


Figura 5: Gráfico de Regresión entre DSL - ELECYS

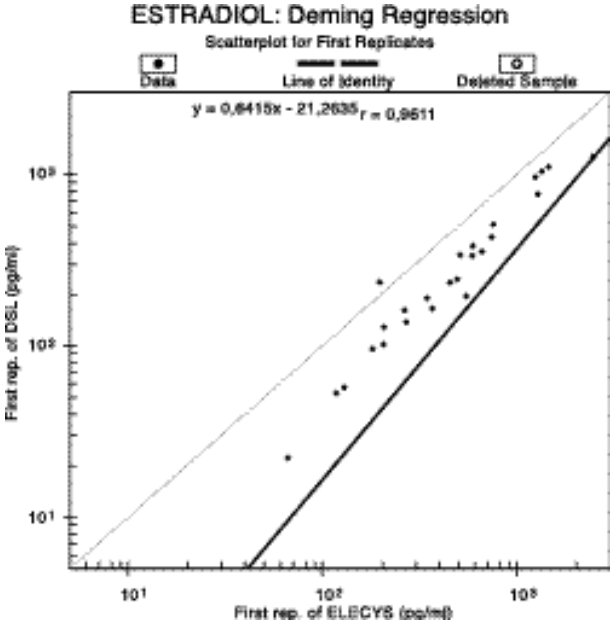
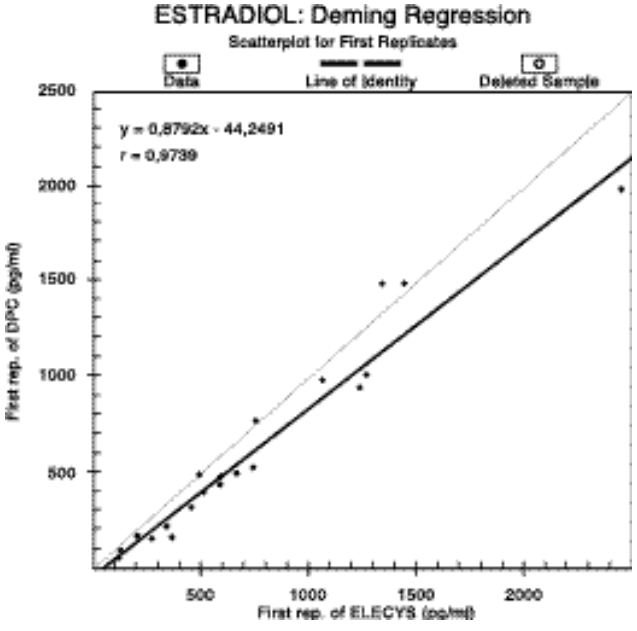


Figura 6: Gráfico de Regresión entre DPC - ELECYS



de DSL-ELE. Con respecto a la ordenada al origen, salvo BYK-ELE, los demás intervalos de confianza incluyen al 0.

En todos los casos analizados, el programa de cálculo de la regresión determinó que la misma es estadísticamente lineal. A pesar que los coeficientes de correlación son buenos, si se los considera aisladamente, no alcanzan a interpretar correctamente el comportamiento de las variables, siendo fundamental para ello tener en cuenta la ecuación que representa cada situación, con su pendiente y ordenada al origen. Esto se puede observar claramente en el cálculo realizado a partir de las ecuaciones obtenidas en el análisis de regresión, (Tabla 5) en el que se obtuvo los valores teóricos que corresponderían para 6 niveles de Estradiol (Tablas 6-7). Con estos valores, se realizaron posteriormente, cocientes entre métodos para obtener una expresión numérica que permita relacionarlos en forma directa. Los niveles elegidos, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 y 1500 pg/ml, abarcaron un rango más amplio de valores para poder observar con mayor detalle el comportamiento entre los métodos.

Método	Ecuación	r
DPC-BYK	BYK = 1,29xDPC - 26,75	0,970
DPC-DSL	DSL = 0,72xDPC + 4,95	0,982
DPC-ELE	ELE = 1,14xDPC + 50,33	0,974
ELE-BYK	BYK = 1,05xELE - 41,80	0,974
ELE-DSL	DSL = 0,64xELE - 21,26	0,961
ELE-DPC	DPC = 0,88xELE - 44,25	0,974

Tabla 5: Ecuaciones de Regresión

Desde el punto de vista estadístico, si bien la conclusión del análisis de Deming fue que en todos hubo linealidad, si se nota los coeficientes de correlación, sólo en el caso de DPC-DSL se cumple la premisa de un $r \geq 0{,}975$ establecida por el NCCLS como requisito para poder usar análisis de regresión lineal en comparación de métodos [1].

Si se usara regresión lineal simple, se produciría error en la estimación estadística de los datos ya que se estaría partiendo de premisas que no son reales cuando se trata del tipo de comparación que se realiza en este trabajo.

La relación DPC/BYK es inversamente proporcional al aumento en los niveles de Estradiol mientras que DPC/DSL y DPC/ELE son directamente proporcionales.

Si se analiza esta relación numérica entre métodos, se observa que hasta un nivel de 500 pg/ml hay mayor variabilidad en la misma y a partir de esa concentración, hay una tendencia general a la uniformidad. Esto permite efectuar un promedio, y poder establecer de manera rápida cómo se pueden relacionar los métodos, a partir de 500 pg/ml: para DPC/BYK el promedio es 0,79; para DPC/DSL es de 1,38 y para DPC/ELE es 0,83. Esto quiere decir que si se está comparando el resultado de una muestra dosada utilizando un kit de DSL con el cual se obtuvo un nivel de 630 pg/ml y se quiere tener una idea del valor que podría tener la misma si se dosara por DPC, éste se obtendría multiplicando 630 por 1,38 resultando 869 pg/ml. Dada la variabilidad a niveles menores de Estradiol mencionada anteriormente, no

DPC (pg/ml)	BYK (pg/ml)	DPC/BYK	DSL (pg/ml)	DPC/DSL	ELE (pg/ml)	DPC/ELE
50	38	1,31	41	1,22	107	0,47
100	102	0,98	77	1,30	164	0,61
250	296	0,84	185	1,35	335	0,75
500	618	0,81	365	1,37	620	0,81
750	941	0,80	545	1,38	905	0,83
1000	1263	0,79	725	1,38	1190	0,84
1500	1908	0,79	1085	1,38	1760	0,85

Tabla 6: Relación numérica entre métodos con respecto a DPC.

ELE (pg/ml)	BYK (pg/ml)	ELE/BYK	DSL (pg/ml)	ELE/DSL	DPC (pg/ml)	ELE/DPC
50	11	4,54	11	4,54	-	-
100	63	1,59	43	2,32	44	2,27
250	221	1,13	139	1,80	176	1,42
500	483	1,03	299	1,67	396	1,26
750	746	1,00	459	1,63	616	1,22
1000	1008	0,99	619	1,61	836	1,20
1500	1533	0,98	939	1,60	1276	1,17

Tabla 7: Relación numérica entre métodos con respecto a ELE.

se puede obtener un promedio general entre las relaciones numéricas de métodos por lo que una comparación como la del ejemplo previo sólo se podría realizar teniendo como punto de partida la ecuación de regresión en la que se colocaría el valor en cuestión. Por ejemplo, y siguiendo con la utilización de DSL, si éste dosara un Estradiol de 82 pg/ml , usando la ecuación de regresión en la que DSL=0,72 x DPC + 4.95 se obtiene 119 pg/ml de Estradiol según DPC.

En este caso se tiene una relación general entre RIA y EQLIA, dosando este último, generalmente, valores más altos de estradiol. Por sus características metodológicas, EQLIA, presenta menor variabilidad y mayor sensibilidad comparado con RIA. Esto podría explicar en parte las diferencias halladas con RIA a valores menores a 500 pg/ml y especialmente los cercanos a 50 pg/ml de ELE.

En todos los casos la relación numérica es inversamente proporcional a los valores de estradiol. En el caso de BYK que parece ser más comparable con ELE que los demás, sus valores son más bajos que ELE hasta 750 pg/ml y son mayores a niveles superiores, aunque con mucha aproximación. Ambos métodos parecen comportarse en general, con mayor uniformidad, especialmente a partir de 500 pg/ml. Al igual que en las comparaciones con DPC, en éste caso se puede efectuar un promedio entre las relaciones numéricas, el que da un valor de 1 lo que indica que con valores superiores a 500 pg/ml los valores entre ambos son equivalentes.

Con DSL y DPC sólo hay mejor concordancia entre las relaciones pertenecientes a niveles superiores a 750 pg/ml y 1000 pg/ml respectivamente. Como ya se informara previamente es muy notoria la diferencia observada entre ELE y DSL.

Discusión

En líneas generales, la forma en que se comparan métodos, es respecto a un método patrón, que en el caso de Estradiol es la Gas Cromatografía-Espectrometría de Masa (GC-EM) [6]. La información obtenida de tal manera permite establecer fehacientemente si un método es mejor que otro a la hora de decidir un reemplazo. En este trabajo, se tuvo en cuenta fundamentalmente que al no realizar una comparación respecto a un método patrón, no se puede inferir cuál de los métodos es mejor que otro. En este sentido la elección de DPC o ELECYS como métodos principales se limitó a lo descrito previamente. Por otra parte, con el análisis de los datos, se pudo establecer una relación matemática entre los métodos, evaluar el comportamiento entre ellos, obteniendo un parámetro mínimo de comparación, que podría ser de utilidad ante una necesidad eventual de tener que interpretar resultados obtenidos por diferentes kits. Es conocida la recomendación de trabajar siempre con resultados obtenidos de un mismo laboratorio, dada la variabilidad observada entre uno y otro, pero en circunstancias en que se necesita cambiar la marca comercial, aún dentro del mismo laboratorio, puede ser útil conocer qué diferencia puede significar ese cambio en términos de futuras determinaciones de Estradiol.

Para efectuar la correlación, se eligió el análisis de regresión de Deming, ya que representa lo que

sucede cuando se correlacionan métodos, en los que no se puede asegurar que el que se elige como referente, está libre de variabilidad. Al respecto, se considera que es una aplicación más correcta desde el punto de vista estadístico, que la regresión lineal simple. Por otra parte, el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) ha emitido un documento con recomendaciones para comparación de métodos, sugiriendo la utilización de esta metodología estadística para trabajos como el que se está presentando.

Desde el punto de vista bioquímico, es reconocida la divergencia que se presenta en los niveles de Estradiol, cuando son dosados por distintos laboratorios, o con diferentes marcas comerciales. Las causas de esta variabilidad se adjudican a factores metodológicos, como diseño, rango de concentración del Estradiol, afinidad y especificidad del anticuerpo, matriz en la que se presentan los estándares, tipo de señal que utiliza el inmunoensayo, etc. Este problema ha llevado a la realización de reuniones internacionales, en la búsqueda de mecanismos que permitan estandarizar las metodologías que actualmente se untilizan en el dosaje de Estradiol. En 1997, Thienpont y col. [7], con el aporte de numerosas compañías realizaron una comparación entre kits comerciales y el método considerado patrón para la determinación de Estradiol, la GC-EM, obteniéndose las ecuaciones de regresión lineal para 16 métodos comparados, entre ellos, los pertenecientes a DPC y ROCHE. Trabajaron con paneles de referencia consistentes en sueros de 5 pacientes de sexo masculino y 12 de sexo femenino a los que se agregaron 5 sueros más suplementados con sueros de embarazadas, para poder obtener valores compatibles con mujeres en hiperestimulación ovárica. Estas muestras fueron alicuotadas, congeladas, y se enviaron a las distintas firmas comerciales para su procesamiento, a la vez que se realizó su determinación por el método patrón. Lamentablemente, como este trabajo fue considerado de carácter confidencial, no es posible conocer a qué marca comercial corresponde cada ecuación de regresión. Disponer de este dato podría haber sido muy útil para este trabajo, ya que permitiría conocer cuánto se apartan los métodos utilizados en este caso, de lo establecido con el método patrón. De todas maneras cabe señalar, que la estadística usada para regresión no es la que se aplicó en este caso. Cada vez es mayor la tendencia a realizar los cálculos de comparación de métodos con regresión Deming, por lo que es posible que en el futuro ésta se aplique con mayor asiduidad. De todas maneras analizando los datos del citado artículo, se observa también la gran variabilidad que presentan las diferentes marcas.

En nuestro país también se hacen esfuerzos por tratar de conocer lo que pasa con los métodos de los que disponemos, y se han realizado trabajos orientados a tal fin.

Benencia y col. compararon [9] marcas comerciales, en pacientes con niveles de rangos bajos de Estradiol [8]. Obtuvieron la sensibilidad funcional de los métodos utilizados, y dentro de las conclusiones expresaron que la elección de un método no sólo debe considerar la sensibilidad funcional sino además la tendencia de su medición respecto a los demás métodos del mercado.

En la bibliografía hay numerosos trabajos en los que se compara el desempeño de diferentes marcas comerciales, como por ejemplo:

- Inmunoensayos no isotópicos automatizados como IMx y ES-300 [9], en los cuales se menciona que hay imprecisión a niveles bajos.
- RIA y EIA automatizado, como DPC, DPC-6 y Bayer Immuno 1 [10], en el que encuentran niveles más altos por DPC en pacientes con terapia de reemplazo hormonal, debido a reacción cruzada del Ac usado, con la estrona. La correlación es mejor con DPC-6.
- RIAs como DPC y Sorin [11] donde aplican regresión de Deming y comparan en 5 muestras el desempeño de DPC respecto a la GC-EM y muestran la ecuación de regresión obtenida: DPC=0,97GCEM + 25. Si se toma por ejemplo un valor de 100 pg/ml de estradiol medido por GC-EM su valor equivalente por DPC sería 122 pg/ml. Este valor mayor por DPC es atribuído a mayor reacción cruzada de conjugados estrogénicos o sus metabolitos.
- RIA y QLIA o EQLIA como Biomerieux e IMMULITE [12], con buena correlación entre ambos; DPC y ACS 180 [13-14]. En el primero encuentran buena correlación general, pero menor para valores bajos, siendo siempre los valores por QLIA superiores a RIA; y en el segundo, se evalúan los niveles de E_2 en 2

tratamientos diferentes en pacientes infértiles: gonadotrofinas y estradiol. En el caso de gonadotrofinas encuentran excelente correlación mientras que con estradiol, los valores de QLIA son 1/3 menores que con RIA, lo que atribuyen a interferencia de metabolitos del estradiol administrado. Finalmente la comparación entre RIA y EQLIA se dio con DPC y ELECYS 2010 [15], con buena correlación y valores por EQLIA superiores a RIA.

Como se puede observar, la diversidad de comparaciones y sus resultados, ponen de manifiesto la necesidad de llegar a un tipo de estandarización de los métodos que permita la expresión de resultados con mayor uniformidad clínica. Si bien se están realizando trabajos en este sentido, todavía se carece de un panel de referencia que logre tal objetivo.

En las comparaciones realizadas en este trabajo, se obtienen las mismas conclusiones que la bibliografía citada, en este caso no se puede hablar de interferencias de metabolitos de estradiol, que hubieran podido aumentar los valores de los RIA, ya que ninguna paciente fue tratada con estrógenos, por lo que las diferencias se pueden atribuir a cuestiones metodológicas exclusivamente. Lo que se plantea como elemento no común a las citas mencionadas es el cálculo de la relación numérica entre los métodos considerados, que da una idea de lo que se puede esperar de un método si se compara con otro. La situación ideal podría ser efectuar las estandarizaciones de los métodos con respecto al patrón de referencia, y a partir de allí, con casuística mayor a la empleada en este caso y con discriminación clínica más detallada, poder efectuar las relaciones entre las distintas metodologías y marcas comerciales.

Para las condiciones en que fue realizado este trabajo, se puede concluir que dentro de los RIA, los que más se asemejan son DSL y DPC y entre RIA y EQLIA, el que más concuerda es BYK a valores mayores a 500 pg/ml. En general, a valores cercanos a 50 pg/ml hay gran variabilidad que se podría deber a menor concentración de la muestra, diferencia en la sensibilidad funcional de los métodos, o menor precisión de los mismos. La comparación que se destacó por su escaso nivel de concordancia fué entre DSL y ELECYS. Esta diferencia tan notable no se puede atribuir a diferentes epítopes ya que ambos dosan el C6 del estradiol, y podría estar a nivel de los estándares utilizados en ambos casos.

En el caso de la comparación entre DSL y DPC, el coeficiente de correlación obtenido fue idéntico al que se informa en un boletín técnico de DSL Labs [16], si bien hay diferencias en la ecuación de regresión cuya pendiente y ordenada al origen son más cercanas a los valores óptimos en el informe técnico. Hay que señalar sin embargo que la estadística de regresión utilizada fue diferente en ambos casos.

Como conclusión, si bien es difícil poder uniformar los resultados entre distintas marcas comerciales, se están realizando trabajos tendientes a ese fin, a través de la estandarización metodológica. Hay distintas herramientas desde el punto de vista estadístico, que en forma creciente parten de premisas que se corresponden más con la realidad, especialmente cuando se trata de comparar métodos. Este trabajo trata de presentar una posibilidad más de conocer qué es lo que sucede localmente, y a partir de allí generar más líneas de estudio con mayor detalle en aspectos clínicos determinados que permitan mejor conocimiento de las herramientas que se disponen en el laboratorio.

Agradecimientos

A la Dra. Silvia Barzón por su inestimable y fundamental participación en el tratamiento estadístico de los resultados de este trabajo.

Bibliografía

1. Licciardi, F.; Liu, H.; Rosenwaks, Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. Fertil Steril 1995; 64(5): 991-994.
2. Speroff, L.; Glass, R.; Kase, N. 1999. Menopause and the Perimenopausal Transition. In: Clinical Ginecologic Endocrinology and Infertility- Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins eds. Wolters Kluwer Company, USA. Pag. 643-724.
3. Speroff, L.; Glass, R.; Kase, N. 1999. Abnormal Puberty and Growth Problems. In: Clinical

Ginecologic Endocrinology and Infertility-Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins eds. Wolters Kluwer Company, USA. Pag. 381-420.
4. Hershlag, A.; Lesser, M.; Montefusco, D. y col. Interinstitutional variability of follicle-stimulating hormone and estradiol levels. Fertil Steril 1992; 58(6): 1123-1126.
5. Martin, R. General Deming Regression for estimating systematic bias and its Confidence Interval in method-comparison studies. Clin Chem 2000; 46 (1) : 100-104.
6. Thienpont, L.; Verhseghe, P.G.; Van Brussel, K.A.; y col. Estradiol-17β quantified in serum by Isotope Dilution–Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Clin Chem 1988; 34(10): 2066-2069.
7. Thienpont, L.; Leenheer, A. Efforts by Industry Toward Standarization of Serum Estradiol-17β Measurements. Clin Chem 1998; 44(3): 671-674.
8. Benencia, H.; Guillén, C.; Sequera, A. y col. Evaluación critica del dosaje de Estradiol. Estudio multicéntrico. Resumen de Congreso. RAEM 1999, 36: 76.
9. Daylily , S.; Laxdal, V.; Pronovost, C. Two commercial automated immunoenzymometric assays for serum Estradiol evaluated. Clin Chem 1994; 40(1): 147-148.
10. Lévesque, A.; Letellier, M.; Dillon, P. y col. Analytical performance of Bayer Immuno I estradiol and progesterone assays. Clin Chem 1997;43(9): 1601-1609.
11. Nisbet, J.; Jomain, P . Discrepancies in plasma estradiol values obtained with commercial kits. Clin Chem 1987, 33(9): 1672.
12. Dancoine, F.; Couplet, G.; Buvat, J. y col. Analytical and clinical evaluation of the Immulite estradiol assay in serum from patients undergoing in vitro fertilization : estradiol increase in mature follicles. Clin Chem 1997; 43(7): 1165-1171.
13. Tummon, I.; Stemp, J.; Rose, C. y col. Precision and method bias of two assays for oestradiol: consequences for decisions in assisted reproduction. Hum Reprod 1999; 14(5): 1175-1177.
14. Hershlag, A.; Zinger, M.; Lesser, M. y col. Is chemiluminiscent immunoassay an appropriate substitution for radioimmunoassay in monitoring estradiol levels? Fertil Steril 2000; 73(6): 1174-1178.
15. Coluccia, G.; Bozo, G.; Perea, J. y col. Serum estradiol (E_2) during ovarian stimulation. Use of electrochemiluminiscense (ECLIA). Actas del 10th World Congress on Human Reproduction Brasil, 1999. Pag. 135-138.
16. DSL Labs Technical Bulletin: DSL Estradiol RIA vs. The DPC Coat-A-Count Estradiol-6 RIA

REVISIÓN

Factores de transcripción que actúan en la formación de la hipófisis.

Transcription factors acting in pituitary induction.

Marui, Suemi; Carvalho, Luciani R. S.; Nishi, Mirian Y.; Latronico, Ana C.; Abraão, Milena; de Melo, Maria E.; Knoepfelmacher, Mirta; Arnhold, Ivo J.P.; Mendonça, Berenice B.

Unidad de Endocrinología del Desarrollo y Laboratorio de Hormonas y Genética Molecular LIM/42,
Cátedra de Endocrinología, Hospital "das Clínicas" de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Pablo.

Introducción

En la última década fueron identificados varios genes que actúan en el desarrollo de la región hipotálamo-hipofisaria. Estos genes codifican una red compleja de factores de transcripción, cuyas acciones son fundamentales para la adquisición y mantenimiento de una función hipofisaria normal [1]. Las mutaciones identificadas en esos genes representan la base molecular de diversas enfermedades. Estos descubrimientos en el área de la genética molecular significó beneficios valiosos para el paciente, como el consejo genético y el tratamiento específico. Por otro lado, el diagnóstico molecular debe ser siempre precedido por una criteriosa y completa evaluación clínica y hormonal, ya que los pacientes presentan el efecto de las mutaciones *in vivo*.

Los factores de transcripción están constituidos por un homeodominio compuesto generalmente por 60 aminoácidos, que presentan homología entre los diversos factores. La región del gen que codifica el homeodominio se denomina *homeobox*. Además del homeodominio, los factores de transcripción presentan características estructurales que permiten clasificarlos en subgrupos con dominios comunes (*paired-like*, POU, LIM, etc.). Los factores de transcripción presentan, también, dominios de activación o represión transcripcional. Ellos controlan la transcripción de sus genes-target, uniéndose a través del homeodominio a sitios específicos del ADN, localizados en la región promotora de los genes-target. Después de la unión del homeodominio a esta región, el dominio de activación transcripcional interactúa directamente con el ADN o recluta co-activadores o corepresores.

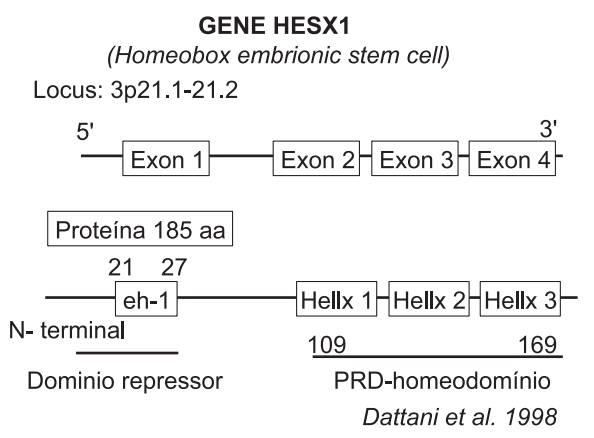
Dirección Postal: Profa. Dra. Berenice B. de Mendonça, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42
Hospital das Clínicas, Caixa Postal: 3671, CEP 01060970, São Paulo, Brasil.
FAX: 55 11 3083-0626, Teléfono: 55 11 3062-6654.
Palabras clave: Genes, crecimiento, hipopituitarismo, eje hipotálamo-hipófisis-GH.
Key words: Genes, Growth, Hypopituitarism, Hypothalamic-Pituitary-GH Axis.

Describiremos en este trabajo el fenotipo y el genotipo secundario a alteraciones en los principales genes involucrados en la secreción de la hormona de crecimiento (GH).

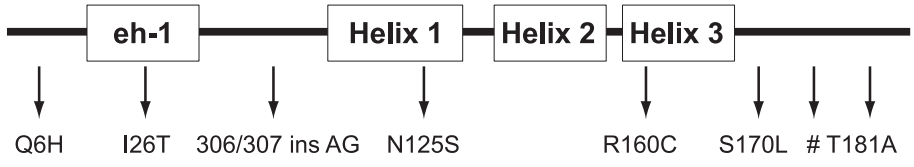
Gen *HESX1/RPX*

El *HESX1* (*Homeobox embryonic stem cell*), también denominado *RPX* (*Rathke pouch homeobox*) es un gen pertenciente a la clase *paired-like homeobox* y está localizado en el cromosoma 3p 21.1-21.2 [2] (Figura 1). El *Hesx1* es el marcador más precoz del origen de la hipófisis, e indica que él tiene un papel específico en el inicio de la diferenciación hipofisaria [3]. El cobayo transgénico nocaut para este gen presenta un fenotipo semejante al síndrome de la displasia del septo óptico (DSO) en el hombre. La DSO se caracteriza por la presencia de dos de los siguientes criterios: hipoplasia del nervio óptico, con alteraciones radiológicas de línea media (como ausencia del septo pelúcido, agenesia de cuerpo calloso, etc.) e hipoplasia hipofisaria. Los primeros estudios de este gen en seres humanos fueron realizados en pacientes con DSO, sin embargo en pocos casos presentaron mutaciones homocigotas o heterocigotas en el gen *HESX1* [4-6]. Hasta el momento se identificaron 8 diferentes mutaciones del gen *HESX1* (Figura 2). El cuadro clínico y radiológico es bastante heterogéneo en las diferentes mutaciones, y también entre los portadores de la misma mutación. Recientemente, identificamos una nueva mutación I26T en homocigotas involucrando a un aminoácido perteneciente al dominio represor del *HESX1* en una paciente con pan-hipopituitarismo y neurohipófisis ectópica, sin alteraciones de las vías ópticas o cerebrales anteriores. Todos los pacientes portadores de mutación en el gen *HESX1* presentan, en común, deficiencia de GH, aislada o asociada a la deficiencia de otras hormonas hipofisarias (Figura 3, 4). Vale destacar que algunos de los pacientes con

Figura



Figura



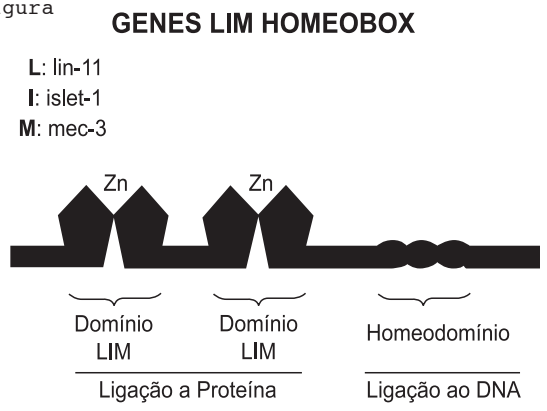
Mutação	Estado	Efeito
Q6H	Heterozigose	ligação normal, ↓ repressão
I26T	Homozigose	ligação normal, ↓ repressão
R160C	Homozigose	sem ligação ao DNA
S170L	Heterozigose	↓ ligação ao DNA
# delG codon175	Heterozigose	↓ da afinidade
T181A	Heterozigose	ligação normal, ↓ repressão
N125S	Polimorfismo afrocaribenho	
306/307 insAG	Heterozigose	*Stop codon*

Figura

10 pacientes descritos com mutação no gene HESX1

- Deficiencia de GH isolada ou combinada - 100%
- Deficiência de cortisol em (40%), evolutiva em apenas 1 deles com a mutação I26T
- Alterações da região Hipotálamo hipofisária (n=9)
  neurohipófise ectópica em 6 pacientes (67%)
  neurohipófise tópica em 3 pacientes (33 %)
  neurohipófise não visualizada em 1 paciente (11%)

Figura



mutación en el *HESX1* también presentaron neurohipófisis ectópica, localizada en la eminencia media o en la base hipofisaria (Figura 3, 4). Este descubrimiento indica una participación de este gen en la migración de la neurohipófisis. El modo de herencia puede ser autosómico recesivo o autosómico dominante con penetrancia incompleta.

Gen *LHX3*

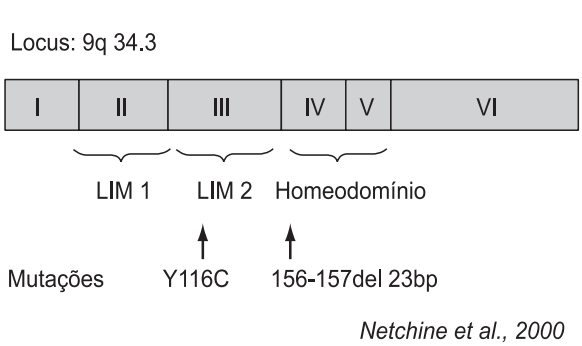
El LHX3 (o Lim3, P-lim) pertenece a los factores de transcripción del tipo homeodominio LIM que actúan en la organogénesis de diversos órganos, principalmente de tejidos neurales. La denominación LIM se origina de las tres iniciales de proteínas con homeodominio que presentan este dominio en común: LIN-11, ISLET-1 y MEC-3 [7] (Figura 5). El gen *LHX3* humano está localizado en el cromosoma 9q 34.3 [8,9]. Netchine y col. describieron un nuevo síndrome asociado a mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *LHX3* en humanos [10] (Figura 6). Los pacientes presentan deficiencia completa de todas las hormonas hipofisarias, excepto de ACTH, asociada a rigidez de la columna cervical, con hombros elevados y anti-vertidos, limitando la rotación de la cabeza a 75-80º (Figura 7). Dos de estos pacientes presentaban hipoplasia hipofisaria severa, mientras que otro paciente presentó inicialmente aumento de la hipófisis, evolucionando posteriormente a hipoplasia. El *LHX3* es

Figura

n de Casos / Idade (a)	Região Hipotalamo-hipofisária	Deficiencia Hormonal	Mutação
2 / (?)	NHE	GH, TSH, cortisol	R160C
2 / (5, 7)	NHT	GH	S170L
1 /(15)*	NHE	GH	S170L
1 /(7)*	NHNV	GH	T181A
1/ (7)	NHE	GH, TSH	Q6H
1/ (2)	NHE	GH, TSH, LH/FSH, cortisol	306/307Ins AG induz a stop codon
1 /(5)	NHE	GH, TSH, LH/FSH, cortisol	I26T
1/(?)	ND	GH	175 delG

*: desenvolveram puberdade espontânea, ND= Não descrita
NHE: neurohipófise ectópica; NHT: neurohipofise tópica; NHNV: neurohipofise não visualiizada

Figura



Figura

- Consangüinidade presente
- Deficiência de GH, TSH, PRL, LH e FSH.
- Ombros antevertidos, rotação cervical limitada a 75- 80º e com a coluna cervical retificada a ressonancia magnética
- Hipoplasia hipofisária ou hiperplasia evoluindo para hipoplasia.

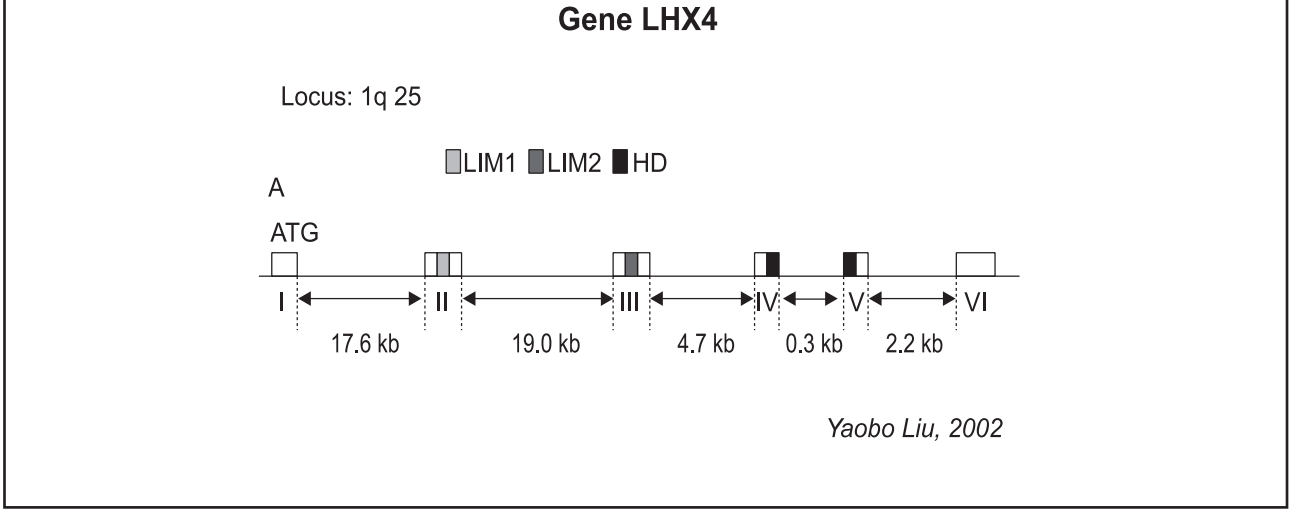
esencial para la diferenciación y proliferación del linaje celular de la adenohipófisis, siendo que las mutaciones en este gen causan desde aumento hipofisario hasta hipoplasia hipofisaria severa y, consecuentemente, pan-hipopituitarismo en humanos. El modo de herencia es autosómico recesivo.

Gen *LHX4*

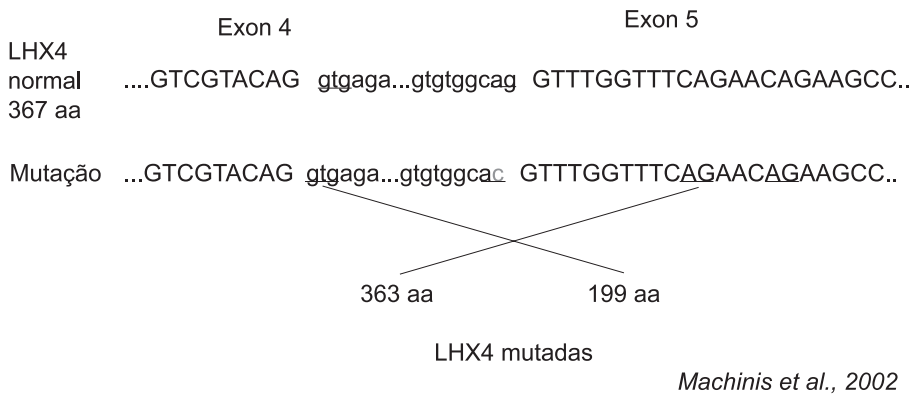
El LHX4 (o Gsh4) también pertenece a los factores de transcripción del tipo homeodominio LIM. El gen *LHX4* humano fue localizado en el cromosoma 1q25 [11] y más recientemente en los locus 1q25 [12] (Figura 8).

Machinis y col. Identificaron una familia con una mutación heterocigota en un sitio de *splicing* del gen *LHX4* [11] (Figura 9). Todos los pacientes presentan baja estatura por hipopituitarismo (deficiencia de GH, PRL, TSH y ACTH), asociada a hipoplasia hipofisaria y defectos cerebelosos (malformación de Chiari) (Figura 10). Esta malformación se caracteriza por el estiramiento de las amígdalas cerebelosas herniándose 5 mm debajo del foramen magno, en forma puntiaguda, pudiendo ser asintomática o causar cefalea, paresia, parestesias, convulsiones, y alteraciones del equilibrio. Puede estar asociada a la presencia de siringomielia e hidrocefalia. En éstos la neurohipófisis estaba en posición ectópica o normal. Por lo tanto, el *LHX4* también participa en la regulación, proliferación y diferenciación de los linajes celulares de la hipófisis. Es interesante destacar que los pacientes con mutación en el *LHX4* no presentaban deficiencia de gonadotrofinas, eran fértiles y transmitieron esa condición a los descendientes. El modo de trasmisión es autosómico dominante.

Figura



Figura



Gen *PROP-1*

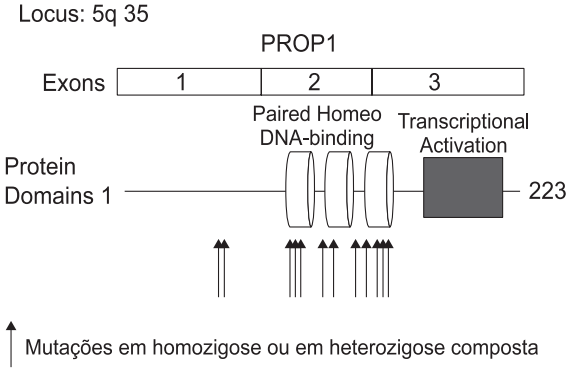
El PROP-1 ("Prophet of Pit-1") es un factor de transcripción del tipo homeodominio *paired-like*, que se expresa específicamente en las células embrionarias de la hipófisis [13]. La designación de "Prophet of Pit-1", indica un gen cuyo producto normalmente precede al PIT-1 y es necesario para la expresión del gen *PIT-1* [13]. El gen *PROP-1* actúa en la ontogénesis, diferenciación y función de los somatotrofos, lactotrofos, y tireotrofos, y gonadotrofos [13]. La primera mutación identificada fue en el cobayo Ames, un modelo animal de pan-hipopituitarismo [13]. El gen *PROP-1* humano está localizado en el cromosoma 5q 35. El *PROP-1* se une como un dímero a los elementos promotores de otras proteínas paired-like incluyendo HESX-1 y al PIT-1. Han sido identificadas doce diferentes mutaciones, que afectaron al homeodominio del gen *PROP-1*, en pacientes con pan-hipopituitarismo con herencia autosómica recesiva [14-18] (Figura 11). La mutación en el gen *PROP-1* es la causa genética más frecuente de pan-hipopituitarismo [19]. La alteración encontrada más frecuente es la deleción de una repetición AG: 301-302. Esta mutación lleva a la formación de una proteína truncada en el codón 109 [20]. La proteína mutante pierde las propiedades de unión al ADN y también la capacidad de activación de la transcripción. Cogan y col. demonstraron que las familias afectadas con la mutación 301-302delAG, provenientes de diversos países, no estaban relacionadas, alejando la posibilidad de un defecto heredado [21]. La ocurrencia frecuente de esta mutación sugiere

Figura

- História familiar de baixa estatura e consangüinidade.
- Deficiência de GH, TSH e cortisol, sem deficiência de prolactina e gonadotrofinas
- Sela túrcica hipodesenvolvida, com a fossa posterior achatada, neurohipófise de localização normal ou ectópica
- Malformação de Chiari I a ressonancia magnética

Machinis et al., 2002

Figura



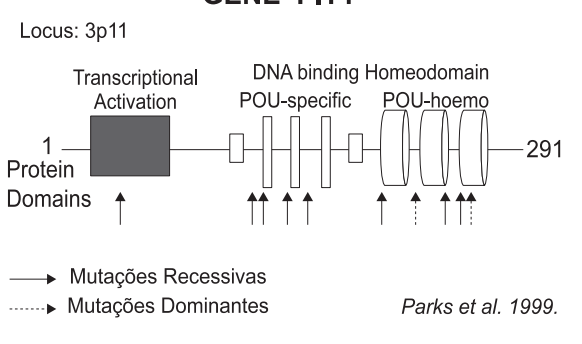
que la repetición AG en el exón 2 (GAGAGAG) predispone a una alinación incorrecta durante la replicación cromosómica. La destrucción 301-302delAG introdujo un nuevo sitio para la enzima de restricción *Bcg* I. Con ello, el rastreo de pacientes con pan-hipopituitarismo para la presencia de esta deleción se efectúa a través de la digestión con *Bcg* I. Otras tres deleciones también resultan en proteína truncada: 149-150delAG [14,17], 150delA [22] y 112-124del [23], así como una nueva mutación del tipo *nonsense* R99X [24]. Las proteínas mutantes perderían los dominios funcionales de unión al ADN y activación de la transcripción. También se identifcaron mutaciones del tipo *missense*: R73C [17,25], R73H [24], F88S [26], F117I [17,20] y R120C [17,20,22] que llevan a la pérdida parcial o completa de la función. Existe también una mutación recurrente en el sitio aceptor de *splicing* en el intrón 2 (343 A>T) (17, 25, 26). La mayoría de los pacientes con mutaciones en el gen *PROP-1* presentan deficiencias hormonales de GH, PRL y TSH, LH y FSH [20], pero también pueden presentar, a lo largo de los años, deficiencia de ACTH con la consiguiente insuficiencia adrenal secundaria [15,27]. Es notable la variabilidad en el fenotipo de los pacientes con mutaciones en el gen *PROP-1*, incluyendo el inicio de la aparición de las deficiencias hormonales [17,22], el tamaño hipofisario [15,20,22,25] y la secreción de cortisol [15,27] (Figura 12). La variabilidad del fenotipo se puede explicar, en parte, por la pérdida parcial o total de la capacidad de unión al ADN y/o de la actividad de la transcripción [20]. La mayoría de los pacientes con pan-hipopituitarismo por alteraciones moleculares en el gen *PROP-1* presentan en la resonancia magnética nuclear parénquima hipofisario disminuido [17,20,22,25,27], sin embargo algunos pacientes pueden tener un período de aumento hipofisario seguido por una hipoplasia severa [15].

La identificación de mutaciones en el gen *PROP1* en diversos pacientes con pan-hipopituitarismo demostró ser éste el gen más frecuentemente involucrado en el hipopituitarismo de causa genética hasta el momento. Por lo tanto, la mutación en el gen *PROP-1* debe ser la primera a ser investigada en pacientes con hipopitutarismo hipofisario. Vale recordar que las deficiencias de las hormonas hipofisarias, inclusive de la GH, pueden aparecer durante el seguimiento del paciente. Recientemente un único paciente con mutación en el gen *PROP-1* alcanzó una altura normal sin tratamiento hormonal adecuado, indicando una nueva variación en el fenotipo [28]. Probablemente ésto ocurrió debido a un grado más importante de hipogonadismo que de déficit de GH, lo que retardó la fusión epifisaria [28].

Figura

- Deficiência de GH, TSH, PRL, LH e FSH
- Podem apresentar deficiência de ACTH
- A sela túrcica pode estar aumentada
- A hipófise pode estar normal, hipoplásica ou hiperplásica evoluindo para hipoplásica
- A neurohipófise é tópica

Figura



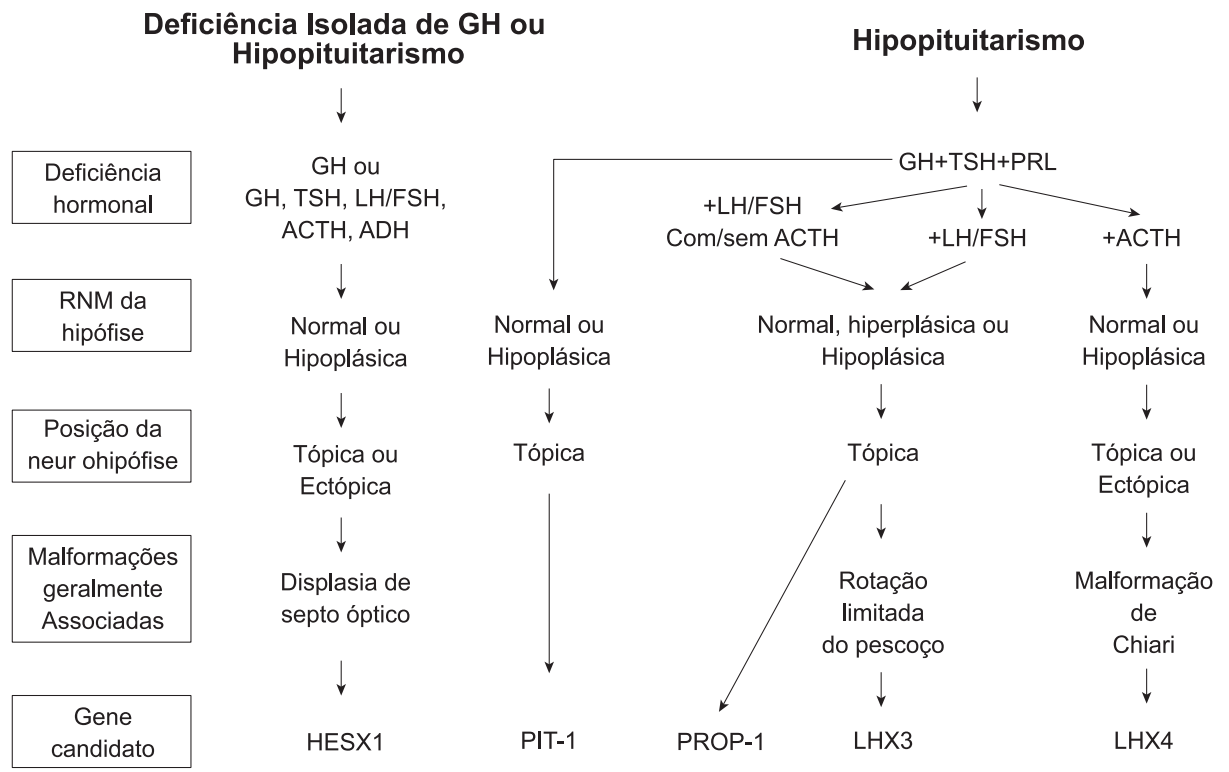
Figura

- Herança autossômica recessiva ou dominante
- Deficiência de GH, PRL e TSH
- Hipófise normal ou pequena e neurohipófise tópica
- Podem apresentar hipotiroidismo congênito

Gen *PIT-1*

El *PIT-1*, también conocido por *GHF1* (*GH factor 1*) ha sido oficialmente denominado de *POU1F1* (*POU domain class 1, transcription factor 1*). El *PIT-1* está localizado en el cromosoma 3p11 y pertenece a la familia POU de los genes homeobox. POU es un acrónimo para Pit, Oct1, que tiene amplia expre-

Figura



sión, Oct2, de expresión en linfocitos B y en ciertas áreas del SNC, y Unc-86, que funciona en el desarrollo neural del C. *elegans* [29]. El PIT-1 contiene 2 dominios proteicos, POU-específico y POU-homeo, ambos necesarios para la unión al ADN de genes que codifican el GH y PRL. El *PIT-1* también es importante para la regulación de los genes que codifican la PRL y la subunidad β del TSH. La proteína PIT-1 generalmente necesita dimerizarse para activar la transcripción. Los cobayos Snell y Jackson, modelos animales de pan-hipopituitarismo, presentan alteraciones en el *Pit-1* [30]. Diversos grupos han descripto pacientes con pan-hipopituitarismo por mutación en el *PIT-1* [31-34] (Figura 13). Han sido identificadas varias mutaciones en el *PIT-1* en casos esporádicos o familiares de pan-hipopituitarismo [31-45]. La herencia puede ser autosómica recesiva, causada por mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas, que producen diversas alteraciones en su unión al ADN o pérdida de la activación de la transcripción [32,33,35-37,41,46]. La herencia también puede ser del tipo autosómica dominante, causada por mutaciones heterocigotas. La proteína mutada tiene una afinidad aumentada por los sitios promotores de GH y PRL, causando un efecto dominante negativo sobre la proteína normal [34,39,42,47,48]. La mutación R271W heterocigota es la más frecuente y ocurre en un dinucleotideo CpG, región propicia para la ocurrencia de mutación. Aproximadamente la mitad de los pacientes afectados son diagnosticados por baja estatura, sin embargo algunos pacientes pueden presentar un cuadro grave de hipotiroidismo congénito. Estos pacientes son una excepción, pues el hipotiroidismo secundario generalmente no es grave. Todos los pacientes con mutación en el gen *PIT-1* presentan deficiencia de GH, PRL y TSH con la hipófisis de tamaño normal o reducido [19,33] (Figura 14).

Como conclusión, presentamos un resumen de las deficiencias hormonales asociadas a alteraciones en la región hipofisaria-hipotalámica con el fin de facilitar la identificación de los pacientes candidatos a mutaciones en los genes que regulan la diferenciación hipofisaria (Figura 15). Los descubrimientos moleculares representan una herramienta adicional, permitiendo la confirmación de una hipótesis clínica formulada previamente y la orientación genética de la familia afectada. Por lo tanto, a pesar de los avances de la biología molecular, la descripción detallada del fenotipo, incluyendo datos clínicos, historia familiar (presencia de consanguinidad y de otros miembros afectados), la evaluación hormonal y los hallazgos en la RNM de la región hipotálamo-hipofisaria son fundamentales para orientar al investigador en la búsqueda de mutaciones en genes ya conocidos o en la búsqueda de nuevos genes candidatos [49].

Bibliografía

1. **Sheng, H.Z.; Moriyama, K.; Yamashita, T. y col.** 1997 Multistep control of pituitary organogenesis. Science 278:1809-12.
2. **Watkins-Chow, D.E.; Camper, S.A.** 1998 How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? Trends Genet 14:284-90.
3. **Hermesz, E.; Mackem, S.; Mahon, K.A.** 1996 Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. Development 122:41-52.
4. **Dattani, M.T.; Martinez-Barbera, J.P.; Thomas, P.Q. y col.** 1998 Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. Nat Genet 19:125-33.
5. **Dattani, M.T.; Martinez-Barbera, J.P.; Thomas, P.Q. y col.** 2000 Molecular genetics of septo-optic dysplasia. Horm Res 53:26-33.
6. **Thomas, P.Q.; Dattani, M.T.; Brickman, J.M. y col.** 2001 Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. Hum Mol Genet 10:39-45.
7. **Zhadanov, A.B.; Bertuzzi, S.; Taira, M. y col.** 1995 Expression pattern of the murine LIM class homeobox gene Lhx3 in subsets of neural and neuroendocrine tissues. Dev Dyn 202:354-64
8. **Sloop, K.W.; Meier, B.C.; Bridwell, J.L. y col.** 1999 Differential activation of pituitary hormone genes by human Lhx3 isoforms with distinct ADN binding properties. Mol Endocrinol 13:2212-25
9. **Sloop, K.W.; Showalter, A.D.; Von Kap-Herr, C. y col.** 2000 Analysis of the human LHX3 neuroendocrine transcription factor gene and mapping to the subtelomeric region of chromosome 9. Gene 245:237-43
10. **Netchine, I.; Sobrier, M.L.; Krude, H. y col.** 2000 Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. Nat Genet 25:182-6
11. **Machinis, K.; Pantel, J.; Netchine, I. y col.** 2001 Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4. Am J Hum Genet 69:961-8.
12. **Liu, Y.; Fan, M.; Yu, S. y col.** 2002 cADN cloning, chromosomal localization and expression pattern analysis of human LIM-homeobox gene LHX4. Brain Res 928:147-55.
13. **Sornson, M.W.; Wu, W.; Dasen, J.S. y col.** 1996 Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. Nature 384:327-33
14. **Fofanova, O.; Takamura, N.; Kinoshita, E. y col.** 1998 Compound heterozygous deletion of the PROP-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 83:2601-4
15. **Mendonça, B.B.; Osorio, M.G.F.; Latronico, A.C. y col.** 1999 Longitudinal hormonal and pituitary imaging changes in two females with combined pituitary hormone deficiency due to deletion of A301,G302 in the PROP-1 gene. J Clin Endocrinol Metab 84:942-945
16. **Rosenbloom AL, A.A.; Brown, M.R.; Fisher, D.A. y col.** 1999 Clinical and biochemical phenotype of familial anterior hypopituitarism from mutation of the PROP1 gene. J Clin Endocrinol Metab 84:50-57
17. **Deladoey, J.; Fluck, C.; Buyukgebiz, A. y col.** 1999 "Hot spot" in the PROP1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 84:1645-50

18. **Nogueira, C.R.; Sabacan, L.; Jameson, J.L. y col.** 1999 Combined pituitary hormone deficiency in an inbred Brazilian kindred associated with a mutation in the PROP-1 gene. Mol Genet Metab 67:58-61
19. **Parks, J.S.; Brown, M.R.; Hurley, D.L. y col.** 1999 Heritable disorders of pituitary development. J Clin Endocrinol Metab 84:4362-70.
20. **Wu, W.C.J.; Pfäffle, R.W.** 1998 Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. Nat Genet. 18:147-149
21. **Cogan, J.D.W.W.; Phillips, J.A. y col.** 1998 The PROP-1 2-bp deletion is a common cause of combined pituitary hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 83:3346-3349
22. **Krzisnik, C.K.Z.; Battelino, T.; Brown, M. y col.** 1999 The "Little People" of the island of Krk-Revisited. Etiology of hypopituitarism revealed. J Endocrine Genet. 1:9-19
23. **Agarwal, G.; Bhatia, V.; Cook, S. y col.** 2000 Adrenocorticotropin deficiency in combined pituitary hormone deficiency patients homozygous for a novel PROP1 deletion. J Clin Endocrinol Metab 85:4556-61.
24. **Vallette-Kasic, S.; Barlier, A.; Teinturier, C. y col.** 2001 PROP1 gene screening in patients with multiple pituitary hormone deficiency reveals two sites of hypermutability and a high incidence of corticotroph deficiency. J Clin Endocrinol Metab 86:4529-35.
25. **Duquesnoy, P.; Roy, A.; Dastot, F. y col.** 1998 Human Prop-1: cloning, mapping, genomic structure. Mutations in familial combined pituitary hormone deficiency. FEBS Lett 437:216-20
26. **Osorio, M.G.; Kopp, P.; Marui, S. y col.** 2000 Combined pituitary hormone deficiency caused by a novel mutation of a highly conserved residue (F88S) in the homeodomain of PROP-1. J Clin Endocrinol Metab 85:2779-85
27. **Pernasetti, F.; Toledo, S.P.; Vasilyev, V.V. y col.** 2000 Impaired adrenocorticotropin-adrenal axis in combined pituitary hormone deficiency caused by a two-base pair deletion (301-302delAG) in the prophet of Pit-1 gene. J Clin Endocrinol Metab 85:390-7.
28. **Arroyo, A.; Pernasetti, F.; Vasilyev, V.V. y col.** 2002 A unique case of combined pituitary hormone deficiency caused by a PROP1 gene mutation (R120C) associated with normal height and absent puberty. Clin Endocrinol (Oxf) 57:283-91.
29. **Bodner, M.; Castrillo, J.L.; Theill, L.E. y col.** 1988 The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox- containing protein. Cell 55:505-18.
30. **Li, S.; Crenshaw, E.B. 3rd; Rawson, E.J. y col.** 1990 Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. Nature 347:528-33.
31. **Tatsumi, K.; Miyai, K.; Notomi, T. y col.** 1992 Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. Nat Genet 1:56-8.
32. **Ohta, K.; Nobukuni, Y.; Mitsubuchi, H. y col.** 1992 Mutations in the Pit-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. Biochem Biophys Res Commun 189:851-5.
33. **Pfaffle, R.W.; DiMattia, G.E.; Parks, J.S. y col.** 1992 Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. Science 257:1118-21.
34. **Radovick, S.; Nations, M.; Du, Y. y col.** 1992 A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. Science 257:1115-8.
35. **Cohen, L.E.; Wondisford, F.E.; Salvatoni, A. y col.** 1995 A "hot spot" in the Pit-1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency: clinical and molecular correlates. J Clin Endocrinol Metab 80:679-84.
36. **Irie, Y.; Tatsumi, K.; Ogawa, M. y col.** 1995 A novel E250X mutation of the PIT1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. Endocr J 42:351-4.
37. **Pellegrini-Bouiller, I.; Belicar, P.; Barlier, A. y col.** 1996 A new mutation of the gene encoding the transcription factor Pit-1 is responsible for combined pituitary hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 81:2790-6.
38. **Aarskog, D.; Eiken, H.G.; Bjerknes, R. y col.** 1997 Pituitary dwarfism in the R271W Pit-1 gene mutation. Eur J Pediatr 156:829-34.
39. **Arnhold, I.J.; Nery, M.; Brown, M.R. y col.** 1998 Clinical and molecular characterization of a Brazilian patient with Pit- 1 deficiency. J Pediatr Endocrinol Metab 11:623-30.
40. **Fofanova, O.V.; Takamura, N.; Kinoshita, E. y col.** 1998 Rarity of PIT1 involvement in children from Russia with combined pituitary hormone deficiency. Am J Med Genet 77:360-5.
41. **Pernasetti, F.; Milner, R.D.; al Ashwal, A.A. y col.** 1998 Pro239Ser: a novel recessive mutation of the Pit-1 gene in seven Middle Eastern chil-

dren with growth hormone, prolactin, and thyrotropin deficiency. J Clin Endocrinol Metab 83:2079-83.

42. **Rodrigues Martineli, A.M.; Braga, M.; De Lacerda, L. y col.** 1998 Description of a Brazilian patient bearing the R271W Pit-1 gene mutation. Thyroid 8:299-304.
43. **Tatsumi, K.; Miyai, K.; Amino, N.** 1998 Genetic basis of congenital hypothyroidism: abnormalities in the TSHbeta gene, the PIT1 gene, and the NIS gene. Clin Chem Lab Med 36:659-62.
44. **Ward, L.; Chavez, M.; Huot, C. y col.** 1998 Severe congenital hypopituitarism with low prolactin levels and age- dependent anterior pituitary hypoplasia: a clue to a PIT-1 mutation. J Pediatr 132:1036-8.
45. **Vallette-Kasic, S.; Pellegrini-Bouiller, I.; Sampieri, F. y col.** 2001 Combined pituitary hormone deficiency due to the F135C human Pit-1 (pituitary-specific factor 1) gene mutation: functional and structural correlates. Mol Endocrinol 15:411-20.
46. **Brown, M.R.; Parks, J.S.; Adess, M.E. y col.** 1998 Central hypothyroidism reveals compound heterozygous mutations in the Pit-1 gene. Horm Res 49:98-102
47. **Okamoto, N.; Wada, Y.; Ida, S. y col.** 1994 Monoallelic expression of normal mRNA in the PIT1 mutation heterozygotes with normal phenotype and biallelic expression in the abnormal phenotype. Hum Mol Genet 3:1565-8.
48. **Nogueira, C.R.; Leite, C.C.; Chedid, E.P. y col.** 1997 Autosomal recessive deficiency of combined pituitary hormones (except ACTH) in a consanguineous Brazilian kindred. J Endocrinol Invest 20:629-33.
49. **Osorio, M.G.; Marui, S.; Jorge, A.A. y col.** 2002 Pituitary Magnetic Resonance Imaging and Function in Patients with Growth Hormone Deficiency with and without Mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 Genes. J Clin Endocrinol Metab 87:5076-5084.

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol 40 • No. 4
Copyright © 2003 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo

REVISIÓN

Fatores de transcriçâo envolvidos na formaçâo da hipófise.

Marui, Suemi; Carvalho, Luciani R. S.; Nishi, Mirian Y.; Latronico, Ana C.; Abraão, Milena; de Melo, Maria E.; Knoepfelmacher, Mirta; Arnhold, Ivo J.P.; Mendonça, Berenice B.

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Introdução

Na última década, vários genes que atuam no desenvolvimento da região hipotálamo-hipofisária foram identificados. Estes genes codificam uma rede complexa de fatores de transcrição, cujas ações são fundamentais para a aquisição e manutenção de uma função hipofisária normal [1]. Mutações identificadas nesses genes representam a base molecular de diversas doenças e benefícios valiosos para o paciente, como aconselhamento genético e tratamento específico, foram conquistados com estas descobertas na área da genética molecular. Entretanto, o diagnóstico molecular deve ser sempre precedido por uma criteriosa e completa avaliação clínica e hormonal, já que os pacientes apresentam o efeito das mutações in vivo.

Os fatores de transcrição são constituídos por um homeodomínio composto geralmente por 60 aminoácidos, que apresentam homologia entre os diversos fatores. A região do gene que codifica o homeodomínio é denominada homeobox Além do homeodomínio, os fatores de transcrição apresentam características estruturais que permitem classificá-los em subgrupos com domínios comuns (paired-like, POU, LIM, etc.). Os fatores de transcrição ainda apresentam domínios de ativação ou repressão transcricional. Eles controlam a transcrição dos seus genes-alvo, ligando-se através do homeodomínio à sítios específicos do DNA, localizados na região promotora dos genes-alvo. Após a ligação do homeodomínio ao gene-alvo, o domínio de ativação transcricional interage diretamente com o DNA ou recruta co-ativadores ou co-repressores.

Descrevemos neste trabalho o fenótipo e o genótipo secundário a alterações nos principais genes envolvidos na secreção do hormônio de crescimento (GH).

Gene HESX1/RPX

O HESX1 (Homeobox embryonic stem cell), também denominado RPX (Rathke pouch homeobox) é um gene pertencente à classe paired-like homeobox e está localizado no cromossomo 3p 21.1-21.2 [2] (Figura 1). O Hesx1 é o marcador mais precoce do primórdio da hipófise, indicando que ele tenha um papel no início da diferenciação hipófisaria [3]. O camundongo transgênico nocaute para este gene apresenta um fenótipo semelhante à síndrome da displasia do septo óptico (DSO) no homem. A DSO

Dir ección Postal: Profa. Dra. Berenice B. de Mendonça, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 Hospital das Clínicas, Caixa Postal: 3671, CEP 01060970, São Paulo, Brasil.
FAX: 55 11 3083-0626, Telefone: 55 11 3062-6654.
Palabras clave: Genes, crescimento, hipopituitarismo, eixo hipotálamo-hipófise-GH.
Key words: Genes, Growth, Hypopituitarism, Hypothalamic-Pituitary-GH Axis.

é caracterizada pela presença de dois dos seguintes critérios: hipoplasia do nervo óptico, alterações radiológicas de linha média (como ausência do septo pelúcido, agenesia de corpo caloso, etc.) e hipoplasia hipofisária. Os primeiros estudos deste gene em humanos foram realizados em pacientes com DSO, porém poucos apresentam mutações em homozigose ou em heterozigose no gene HESX1 [4-6]. Até o momento foram descritas 8 diferentes mutações do gene HESX1 (Figura 2). O quadro clínico e radiológico é bastante heterogêneo nas diferentes mutações, e também entre os portadores da mesma mutação. Recentemente, identificamos uma nova mutação I26T em homozigose envolvendo um aminoácido pertencente ao domínio repressor do HESX1 em uma paciente com pan-hipopituitarismo e neurohipófise ectópica, sem alterações de vias ópticas ou cerebrais anteriores. Em comum, todos os pacientes portadores de mutação no gene HESX1 apresentam deficiência de GH, isolada ou associada à deficiência de outros hormônios hipofisários (Figura 3, 4). Vale ressaltar que alguns dos pacientes com mutação no HESX1 também apresentaram a neurohipófise ectópica, localizada na eminência média ou na haste hipofisária (Figura 3, 4). Este achado indica uma participação deste gene na migração da neurohipófise. O modo de herança pode ser autossômico recessivo ou autossômico dominante com penetrância incompleta.

Gene LHX3

O LHX3 (ou Lim3, P-lim) pertence aos fatores de transcrição da classe homeodomínio LIM envolvidos na organogênese de diversos órgãos, principalmente tecidos neurais. A denominação LIM origina-se das três iniciais de proteínas com homeodomínio que apresentam este domínio em comum: LIN-11, ISLET-1 e MEC-3 [7] (Figura 5). O gene LHX3 humano está localizado no cromossomo 9q 34.3 [8,9]. Netchine et al. descreveram uma nova síndrome associada a mutações em homozigose ou heterozigose composta no gene LHX3 em humanos [10] (Figura 6). Os pacientes apresentam deficiência completa de todos os hormônios hipofisários, exceto de ACTH, associada a rigidez da coluna cervical, com ombros elevados e anti-vertidos, limitando a rotação da cabeça a 75-80º (Figura 7). Dois destes pacientes apresentavam hipoplasia hipofisária severa, enquanto outro paciente apresentou inicialmente aumento da hipófise, evoluindo posteriormente para hipoplasia. O LHX3 é essencial para a diferenciação e proliferação das linhagens celulares da adenohipófise, sendo que mutações neste gene causam desde aumento hipofisário até hipoplasia hipofisária severa e conseqüentemente pan-hipopituitarismo em humanos. O modo de herança é autossômico recessivo.

Gene LHX4

O LHX4 (ou Gsh4) também pertence aos fatores de transcrição da classe homeodomínio LIM. O gene LHX4 humano foi localizado no cromossomo 1q25 [11] e mais recentemente no locus 1q25 [12] (Figura 8).

Machinis et al. relataram uma família com uma mutação em heterozigose em um sítio de splicing do gene LHX4 [11] (Figura 9). Todos os pacientes apresentam baixa estatura por hipopituitarismo (deficiência de GH, PRL, TSH e ACTH), associada a hipoplasia hipofisária e defeitos cerebelares (malformação de Chiari) (Figura 10). Esta malformação caracteriza-se por alongamento das tonsilas cerebelares com herniação maior que 5 mm abaixo do forame magno, em forma pontiaguda, podendo ser assintomática ou causar cefaléia, fraqueza, parestesias, convulsões, e distúrbios do equilíbrio. Pode estar associada a presença de siringomielia e hidrocefalia. Nestes pacientes a neurohipófise estava em posição ectópica ou normal. Portanto, o LHX4 também participa na regulação, proliferação e diferenciação das linhagens celulares da hipófise. Interessantemente, os pacientes com mutação no LHX4 não apresentavam deficiência de gonadotrofinas, eram férteis e transmitiram a condição aos descendentes. O modo de herança é autossômico dominante.

Gene PROP-1

O PROP-1 (“Prophet of Pit-1”) é um fator de transcrição do tipo homeodomínio paired-like, que é expresso especificamente nas células embrionárias da hipófise [13]. A designação de “Prophet of Pit-1,”

indica um gene cujo produto normalmente precede o PIT-1 e é necessário para a expressão do gene PIT-1 [13]. O gene PROP-1 está envolvido na ontogênese, diferenciação e função dos somatotrofos, lactotrofos, e tireotrofos, e gonadotrofos [13]. A primeira mutação identificada foi no camundongo Ames, um modelo animal de pan-hipopituitarismo [13]. O gene PROP-1 humano está localizado no cromossomo 5q 35. O PROP-1 se liga como um dímero aos elementos promotores de outras proteínas paired-like incluindo HESX-1 e ao PIT-1. Doze diferentes mutações, afetando o homeodomínio do gene PROP-1, foram identificadas em pacientes com pan-hipopituitarismo com herança autossômica recessiva [14-18] (Figura 11). Mutação no gene PROP-1 é a causa genética mais freqüente de pan-hipopituitarismo [19]. A alteração encontrada mais freqüente é a deleção em uma repetição AG: 301-302delAG. Esta mutação leva à formação de uma proteína truncada no códon 109 [20]. A proteína mutante perde as propriedades de ligação ao DNA e também a capacidade de ativação da transcrição. Cogan et al. demonstraram que as famílias afetadas com a mutação 301-302delAG, provenientes de diversos países, não eram relacionadas, afastando a possibilidade de um efeito fundador [21]. A ocorrência freqüente desta mutação sugere que a repetição AG no exon 2 (GAGAGAG) predispõe a um alinhamento incorreto durante a replicação cromossômica. A deleção 301-302delAG introduz um novo sítio para a enzima de restrição Bcg I. Com isso o rastreamento de pacientes com pan-hipopituitarismo para a presença desta deleção é feita através da digestão com Bcg I. Três outras deleções também resultam em proteína truncada: 149-150delAG (14, 17), 150delA [22] e 112-124del [23], assim como uma nova mutação do tipo nonsense R99X [24]. As proteínas mutantes perderiam os domínios funcionais de ligação ao DNA e ativação da transcrição. Também foram relatadas mutações do tipo missense: R73C [17,25], R73H [24], F88S [26], F117I [17,20] e R120C [17,20,22] que levam a perda parcial ou completa da função. Existe também uma mutação recorrente no sítio aceptor de splicing (processamento) no intron 2 (343 A>T) [17,25,26]. A maioria dos pacientes com mutações no gene PROP-1 apresentam deficiências hormonais de GH, PRL e TSH, LH e FSH [20], mas também podem apresentar, ao longo dos anos, deficiência de ACTH com conseqüente insuficiência adrenal secundária [15,27]. É notável a variabilidade no fenótipo dos pacientes com mutações no gene PROP-1, incluindo o início do aparecimento das deficiências hormonais [17,22], o tamanho hipofisário [15,20,22,25] e a secreção de cortisol [15,27] (Figura 12). A variabilidade do fenótipo pode ser explicada, em parte, pela perda parcial ou total da capacidade de ligação ao DNA e/ou da atividade da transcrição [20]. A maioria dos pacientes com pan-hipopituitarismo por alterações moleculares no gene PROP-1 apresenta à ressonância nuclear magnética parênquima hipofisário diminuído [17,20,22.25,27], porém alguns pacientes podem ter um período de aumento hipofisário seguido por uma hipoplasia severa [15].

A identificação de mutações no gene PROP1 em diversos pacientes com pan-hpopituitarismo demonstrou ser este o gene o mais freqüentemente envolvido no hipopituitarismo de causa genética até o momento. Portanto, mutação no gene PROP-1 deve ser a primeira a ser pesquisada em pacientes com hipopitutarismo hipofisário. Vale lembrar que as deficiências dos hormônios hipofisários, inclusive do GH, podem aparecer durante o seguimento do paciente. Recentemente um único paciente com mutação no gene PROP-1 atingiu altura normal sem tratamento hormonal adequado, indicando uma nova variação no fenótipo [28]. Provavelmente isto ocorreu pelo grau mais importante de hipogonadismo que a deficiência de GH, o que retardou a fusão epifisária [28].

Gene PIT-1

O PIT-1, também conhecido por GHF1 (GH factor 1) tem sido oficialmente denominado de POU1F1 (POU domain class 1, transcription factor 1). O PIT-1 está localizado no cromossomo 3p11 e pertence à família POU dos genes homeobox. POU é um acrônimo para Pit, Oct1, que tem ampla expressão, Oct2, que tem expressão em linfócitos B e em certas áreas do SNC, e Unc-86, que funciona no desenvolvimento neural do C. elegans [29]. O PIT-1 contém 2 domínios protéicos, POU-específico e POU-homeo, ambos necessários para a ligação ao DNA de genes que codificam o GH e PRL. O PIT-1 é também importante para a regulação dos genes que codificam a PRL e a subunidade β do TSH. A proteína PIT-1 geralmente necessita se dimerizar

para ativar a transcrição. Os camundongos Snell e Jackson, modelos animais de pan-hipopituitarismo, apresentam alterações no Pit-1 [30]. Pacientes com pan-hipopituitarismo por mutação no PIT-1 foram descritos por diversos grupos [31-34] (Figura 13). Várias mutações no PIT-1 têm sido reconhecidas em casos esporádicos ou familiares de pan-hipopituitarismo [31-45]. A herança pode ser autossômica recessiva, causada por mutações em homozigose ou heterozigose composta, que produzem vários graus de perda de ligação ao DNA ou perda da ativação da transcrição [32,33,35-37,41,46]. A herança também pode ser do tipo autossômica dominante, causada por mutações em heterozigose. A proteína mutante tem uma afinidade aumentada pelos sítios promotores de GH e PRL, causando um efeito dominante negativo sobre a proteína normal [34,39,42,47,48]. A mutação R271W em heterozigose é a mais freqüente e ocorre em um dinucleotídeo CpG, região propícia para ocorrência de mutação. Aproximadamente a metade dos pacientes afetados é diagnosticada por baixa estatura, porém alguns pacientes podem apresentar um quadro grave de hipotireoidismo congênito. Estes pacientes são uma exceção, pois o hipotireoidismo secundário não é acompanhado de hipotireoidismo grave. Todos os pacientes com mutação no gene PIT-1 apresentam deficiência de GH, PRL e TSH com a hipófise de tamanho normal ou reduzido [19,33] (Figura 14).

Em conclusão, apresentamos um sumário das deficiências hormonais associadas a alterações na região hipofisária-hipotalâmica com o intuito de facilitar a identificação dos pacientes candidatos a mutações nos genes que regulam a diferenciação hipofisária (Figura 15). Os achados moleculares representam uma ferramenta adicional, permitindo a confirmação de uma hipótese clínica formulada previamente e o aconselhamento genético da família afetada. Portanto, apesar dos avanços da biologia molecular, a descrição detalhada do fenótipo, incluindo dados clínicos, história familiar (presença de consangüinidade e de outros membros afetados), a avaliação hormonal e os achados da RNM da região hipotálamo-hipofisária são fundamentais para orientar o pesquisador na busca de mutações em genes já conhecidos ou na procura de novos genes candidatos [49].

Bibliografía

1. Sheng, H.Z.; Moriyama, K.; Yamashita, T. y col. 1997 Multistep control of pituitary organogenesis. Science 278:1809-12.
2. Watkins-Chow, D.E.; Camper, S.A. 1998 How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? Trends Genet 14:284-90.
3. Hermesz, E.; Mackem, S.; Mahon, K.A. 1996 Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. Development 122:41-52.
4. Dattani, M.T.; Martinez-Barbera, J.P.; Thomas, P.Q. y col. 1998 Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. Nat Genet 19:125-33.
5. Dattani, M.T.; Martinez-Barbera, J.P.; Thomas, P.Q. y col. 2000 Molecular genetics of septo-optic dysplasia. Horm Res 53:26-33.
6. Thomas, P.Q.; Dattani, M.T.; Brickman, J.M. y col. 2001 Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. Hum Mol Genet 10:39-45.
7. Zhadanov, A.B.; Bertuzzi, S.; Taira, M. y col. 1995 Expression pattern of the murine LIM class homeobox gene Lhx3 in subsets of neural and neuroendocrine tissues. Dev Dyn 202:354-64
8. Sloop, K.W.; Meier, B.C.; Bridwell, J.L. y col. 1999 Differential activation of pituitary hormone genes by human Lhx3 isoforms with distinct ADN binding properties. Mol Endocrinol 13:2212-25
9. Sloop, K.W.; Showalter, A.D.; Von Kap-Her r, C. y col. 2000 Analysis of the human LHX3 neuroendocrine transcription factor gene and mapping to the subtelomeric region of chromosome 9. Gene 245:237-43
10. Netchine, I.; Sobrier, M.L.; Krude, H. y col. 2000 Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. Nat Genet 25:182-6
11. Machinis, K.; Pantel, J.; Netchine, I. y col. 2001

Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4. Am J Hum Genet 69:961-8.
12. Liu, Y.; Fan, M.; Yu, S. y col. 2002 cADN cloning, chromosomal localization and expression pattern analysis of human LIM-homeobox gene LHX4. Brain Res 928:147-55.
13. Sornson, M.W.; Wu, W.; Dasen, J.S. y col. 1996 Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. Nature 384:327-33
14. Fofanova, O.; Takamura, N.; Kinoshita, E. y col. 1998 Compound heterozygous deletion of the PROP-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 83:2601-4
15. Mendonça, B.B.; Osorio, M.G.F.; Latronico, A.C. y col. 1999 Longitudinal hormonal and pituitary imaging changes in two females with combined pituitary hormone deficiency due to deletion of A301,G302 in the PROP-1 gene. J Clin Endocrinol Metab 84:942-945
16. Rosenbloom AL, A.A.; Brown, M.R.; Fisher, D.A. y col. 1999 Clinical and biochemical phenotype of familial anterior hypopituitarism from mutation of the PROP1 gene. J Clin Endocrinol Metab 84:50-57
17. Deladoey, J.; Fluck, C.; Buyukgebiz, A. y col. 1999 "Hot spot" in the PROP1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 84:1645-50
18. Nogueira, C.R.; Sabacan, L.; Jameson, J.L. y col. 1999 Combined pituitary hormone deficiency in an inbred Brazilian kindred associated with a mutation in the PROP-1 gene. Mol Genet Metab 67:58-61
19. Parks, J.S.; Brown, M.R.; Hurley, D.L. y col. 1999 Heritable disorders of pituitary development. J Clin Endocrinol Metab 84:4362-70.
20. Wu, W.C.J.; Pfäffle, R.W . 1998 Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. Nat Genet. 18:147-149
21. Cogan, J.D.W.W.; Phillips, J.A. y col. 1998 The PROP-1 2-bp deletion is a common cause of combined pituitary hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 83:3346-3349
22. Krzisnik, C.K.Z.; Battelino, T.; Brown, M. y col. 1999 The "Little People" of the island of Krk-Revisited. Etiology of hypopituitarism revealed. J Endocrine Genet. 1:9-19
23. Agarwal, G.; Bhatia, V.; Cook, S. y col. 2000 Adrenocorticotropin deficiency in combined pituitary hormone deficiency patients homozygous for a novel PROP1 deletion. J Clin Endocrinol Metab 85:4556-61.
24. Vallette-Kasic, S.; Barlier, A.; Teinturier, C. y col. 2001 PROP1 gene screening in patients with multiple pituitary hormone deficiency reveals two sites of hypermutability and a high incidence of corticotroph deficiency. J Clin Endocrinol Metab 86:4529-35.
25. Duquesnoy, P.; Roy, A.; Dastot, F. y col. 1998 Human Prop-1: cloning, mapping, genomic structure. Mutations in familial combined pituitary hormone deficiency. FEBS Lett 437:216-20
26. Osorio, M.G.; Kopp, P.; Marui, S. y col. 2000 Combined pituitary hormone deficiency caused by a novel mutation of a highly conserved residue (F88S) in the homeodomain of PROP-1. J Clin Endocrinol Metab 85:2779-85
27. Pernasetti, F.; Toledo, S.P.; Vasilyev, V.V. y col. 2000 Impaired adrenocorticotropin-adrenal axis in combined pituitary hormone deficiency caused by a two-base pair deletion (301-302delAG) in the prophet of Pit-1 gene. J Clin Endocrinol Metab 85:390-7.
28. Arroyo, A.; Pernasetti, F.; Vasilyev, V.V. y col. 2002 A unique case of combined pituitary hormone deficiency caused by a PROP1 gene mutation (R120C) associated with normal height and absent puberty. Clin Endocrinol (Oxf) 57:283-91.
29. Bodner, M.; Castrillo, J.L.; Theill, L.E. y col. 1988 The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox- containing protein. Cell 55:505-18.
30. Li, S.; Crenshaw, E.B. 3rd; Rawson, E.J. y col. 1990 Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. Nature 347:528-33.
31. Tatsumi, K.; Miyai, K.; Notomi, T. y col. 1992 Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. Nat Genet 1:56-8.
32. Ohta, K.; Nobukuni, Y.; Mitsubuchi, H. y col. 1992 Mutations in the Pit-1 gene in children with

combined pituitary hormone deficiency. Biochem Biophys Res Commun 189:851-5.
33. Pfaffle, R.W.; DiMattia, G.E.; Parks, J.S. y col. 1992 Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. Science 257:1118-21.
34. Radovick, S.; Nations, M.; Du, Y. y col. 1992 A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. Science 257:1115-8.
35. Cohen, L.E.; W ondisfor d, F.E.; Salvatoni, A. y col. 1995 A "hot spot" in the Pit-1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency: clinical and molecular correlates. J Clin Endocrinol Metab 80:679-84.
36. Irie, Y.; Tatsumi, K.; Ogawa, M. y col. 1995 A novel E250X mutation of the PIT1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. Endocr J 42:351-4.
37. Pellegrini-Bouiller, I.; Belicar, P.; Barlier, A. y col. 1996 A new mutation of the gene encoding the transcription factor Pit-1 is responsible for combined pituitary hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 81:2790-6.
38. Aarskog, D.; Eiken, H.G.; Bjerknes, R. y col. 1997 Pituitary dwarfism in the R271W Pit-1 gene mutation. Eur J Pediatr 156:829-34.
39. Arnhold, I.J.; Ner y, M.; Brown, M.R. y col. 1998 Clinical and molecular characterization of a Brazilian patient with Pit- 1 deficiency. J Pediatr Endocrinol Metab 11:623-30.
40. Fofanova, O.V.; Takamura, N.; Kinoshita, E. y col. 1998 Rarity of PIT1 involvement in children from Russia with combined pituitary hormone deficiency. Am J Med Genet 77:360-5.
41. Pernasetti, F.; Milner, R.D.; al Ashwal, A.A. y col. 1998 Pro239Ser: a novel recessive mutation of the Pit-1 gene in seven Middle Eastern children with growth hormone, prolactin, and thyrotropin deficiency. J Clin Endocrinol Metab 83:2079-83.
42. Rodrigues Martineli, A.M.; Braga, M.; De Lacerda, L. y col. 1998 Description of a Brazilian patient bearing the R271W Pit-1 gene mutation. Thyroid 8:299-304.
43. Tatsumi, K.; Miyai, K.; Amino, N. 1998 Genetic basis of congenital hypothyroidism: abnormalities in the TSHbeta gene, the PIT1 gene, and the NIS gene. Clin Chem Lab Med 36:659-62.
44. Ward, L.; Chavez, M.; Huot, C. y col. 1998 Severe congenital hypopituitarism with low prolactin levels and age- dependent anterior pituitary hypoplasia: a clue to a PIT-1 mutation. J Pediatr 132:1036-8.
45. Vallette-Kasic, S.; Pellegrini-Bouiller, I.; Sampieri, F. y col. 2001 Combined pituitary hormone deficiency due to the F135C human Pit-1 (pituitary-specific factor 1) gene mutation: functional and structural correlates. Mol Endocrinol 15:411-20.
46. Brown, M.R.; Parks, J.S.; Adess, M.E. y col. 1998 Central hypothyroidism reveals compound heterozygous mutations in the Pit-1 gene. Horm Res 49:98-102
47. Okamoto, N.; Wada, Y.; Ida, S. y col. 1994 Monoallelic expression of normal mRNA in the PIT1 mutation heterozygotes with normal phenotype and biallelic expression in the abnormal phenotype. Hum Mol Genet 3:1565-8.
48. Nogueira, C.R.; Leite, C.C.; Chedid, E.P. y col. 1997 Autosomal recessive deficiency of combined pituitary hormones (except ACTH) in a consanguineous Brazilian kindred. J Endocrinol Invest 20:629-33.
49. Osorio, M.G.; Marui, S.; Jorge, A.A. y col. 2002 Pituitary Magnetic Resonance Imaging and Function in Patients with Growth Hormone Deficiency with and without Mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 Genes. J Clin Endocrinol Metab 87:5076-5084.

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol 40 • No. 4
Copyright © 2003 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo

ACTUALIZACIÓN

Discovery of the Carney Complex, a Familial Lentiginosis-Multiple Endocrine Neoplasia Syndrome: A Medical Odyssey

J. Aidan Carney, MD, PHD, FRCPI

Emeritus Member, Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota.

The Endocrinologist ® 2003; volume 13, number 1, pages 23-30, by Lippincott Williams & Wilkins
Chief Editor's Note: This article is the 1st of 36 that will be published in 2003 for which a total of up to 36 Category 1 CME credits can be earned. Instructions for how credits can be earned appear following the Table of Contents.

Abstract

In 1981, study of the adrenal pathology in four cases of Cushing syndrome led to characterization of a unique disorder termed primary pigmented nodular adrenal disease (PPNAD). Review of the literature showed that the condition occurred in two families. In one, it had affected two siblings; a third sibling who did not have Cushing syndrome died of cardiac myxoma. To test the hypothesis that there was a connection between PPNAD and cardiac myxoma, the Mayo Clinic files and the world literature were searched for patients with both conditions. The search uncovered one Mayo Clinic patient with the two conditions. The patient's record revealed that she was "covered in pigmented moles" and had a myxomatous tumor of the breast. A review of the literature on cardiac myxoma revealed that there were two types of the tumor, nonfamilial and familial, and that rare cases of the latter were variously associated with cutaneous pigmented spots, mammary and cutaneous myxomas, large-cell calcifying Sertoli cell tumor, and growth hormone-producing pituitary adenoma. In 1985, all these conditions were assembled into a unifying syndrome and reported as "the complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity" (Carney complex).

Learning Objectives
- Summarize the history of how primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) came to be recognized as part of a discrete syndrome or complex.
- Identify the pathological conditions associated with PPNAD, focusing on cardiac and other myxomas.
- Illustrate the way in which the Carney complex is inherited and its implications for clinical practice.

Cushing Syndrome and Unusual Adrenal Pathologic Findings

In February 1975, a 17-year-old woman with Cushing syndrome underwent bilateral adrenalectomy at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota. Biochemical testing indicated autonomous adrenocortical function and, therefore, the probable presence of a cortisol-secreting adrenal adenoma. The localization studies, however, had not shown an adrenal tumor. The

Dirección Postal:: J.A. Carney, M.D., Mayo Clinic, 200 First Street SW, Rochester, Minnesota 55905.
Telephone: 507-284-2691; Fax 507-284-5036; e-mail: carney.aidan@mayo.edu

patient was operated on with the hope that a small adrenal adenoma would be found. Instead, both adrenal glands were similarly abnormal and both were removed. The glands were smaller than normal (total weight, 7 g, normal weight, approximately 9 g) and both had almost complete transformation of the cortex into multiple, small, black, and brown nodules (Fig. 1A [top]). Microscopically, the nodules were generally spherical and located deep in the cortex, often straddling the corticomedullary junction. Some had replaced the normal cortex entirely and impinged on the adrenal capsule causing black discoloration of the external surface of the glands. The cells constituting the nodules were large, sometimes huge, with granular, eosinophilic, pigment-containing cytoplasm (Fig. 1A [bottom]). The extranodular cortex was atrophic.

A New Adrenal Pathologic Entity?

The examining pathologist who did not make a specific diagnosis shared the case with me. Pathologically, the findings were strikingly different from those of other bilateral causes of Cushing syndrome, bilateral cortical hyperplasia (ACTH-dependent), and macronodular hyperplasia. Might they represent a distinct entity, rare or perhaps undiscovered? In the spring of 1975, when I presented the case to the Department of Endocrinology, the follow-

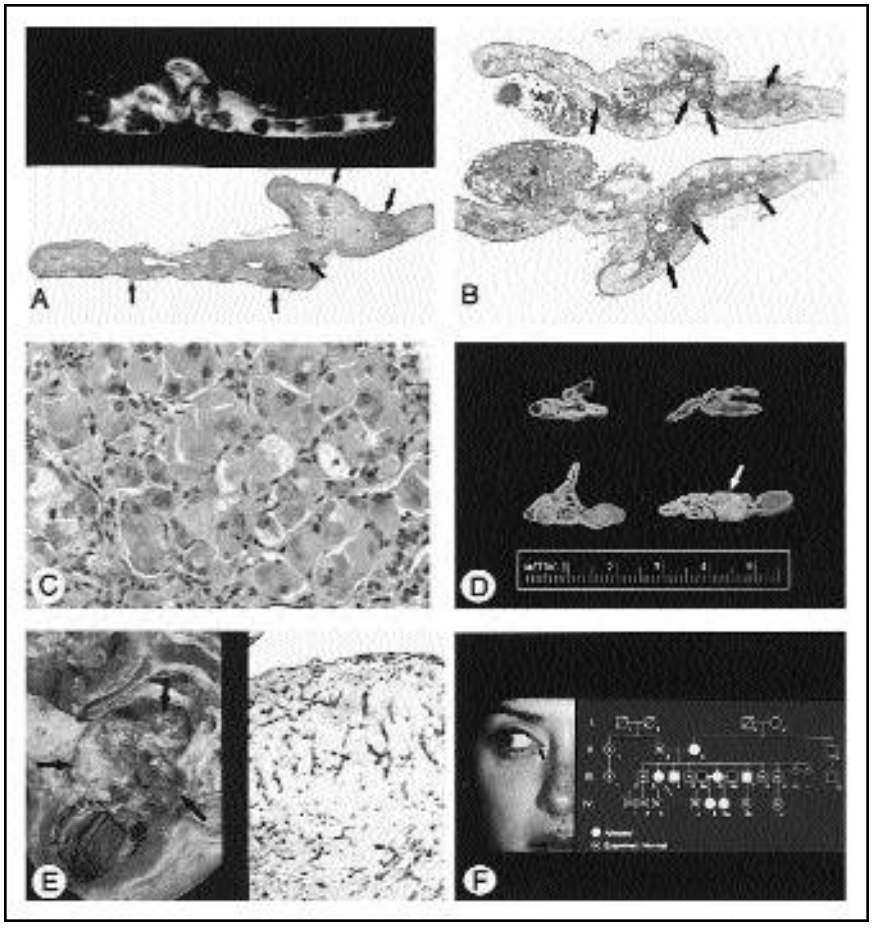


FIGURE 1.A. Primary pigmented nodular adrenocortical disease. Top, The cut surface shows multiple black-and-brown nodules, some con ouent, which have largely replaced the yellow cortex. Bottom,low-power panoramic view of a slice of adrenal, showing multiple cortical nodules (arrows) (Periodic acid-Schiff; 2). **B.** Primary pigmented nodular adrenocortical disease in index patient of Carney complex. Low power photomicrograph of consecutive slices of adrenal shows cortex and medulla. Scattered nodules are present deep in the cortex (arrows). A large nodule (asterisk) has mushroomed from the cortex into the peri-adrenal fat (Periodic acid-Schiff; 2). **C.** Cortical nodule composed of large cells with eosinophilic (pink) cytoplasm and nuclei with occasionally discernible nucleoli. The cytoplasm of most cells contains lipochrome pigment, sometimes disposed in a ring-like fashion.(Hematoxylin-eosin;400.). **D.** Cut surfaces of four slices of adrenal show multiple light and dark brown nodules and one partly yellow nodule (arrow).The nodules measured 1 to 5 mm in diameter. The yellow cortex is readily visible. **E.** Cardiac myxoma in index patient of Carney complex. Left, Opened left atrium is olled with a cauli oower-like, red gelatinous mass (arrows). The trabeculae carneae of the left ventricle and a mitral papillary muscle are seen below the mass. Right, Myxoma featuring mainly capillaries set in a hypocellular matrix and covered by intact endothelium (above) (Hematoxylin-eosin;63). **F.** Dominant inheritance of the Carney complex. Left, Index patient of family with spotty pigmentation of nose and upper lip and typical pigmentation of the conjunctiva covering the lacrimal caruncle. Right, pedigree showing affected and unaffected family member.

ing objections were raised to this notion: (1) there was nothing clinically unusual about the patient's Cushing syndrome (I agreed); (2) adrenal nodules are common (I agreed that they are common, but they are not common at age 19, and certainly not with the characteristics of being multiple, small, black and brown, and bilateral); and (3) I presented only one case (I agreed).

Study of the Adrenal Pathologic Findings: 1981

By 1980, I had encountered two new cases with the same unusual adrenal pathology associated with Cushing syndrome and found a fourth from 1953 in departmental photographic files (Table 1). I began a study of the cases in late 1981 by seeking additional examples of the disorder through a review of the Mayo Clinic files and the world literature. Review of the adrenal slides of the 281 Mayo Clinic patients who had undergone bilateral or subtotal adrenalectomy or bilateral biopsy for Cushing syndrome or for other disorders before 1981 did not reveal any with the peculiar pathology. Search of the literature, however, uncovered 24 cases with pathologic findings similar to the four Mayo Clinic cases. The cases were reported by 18 authors, the first in 1947. Six of the cases occurred in two families [1,2]. This familial occurrence was encouraging evidence that the disorder under study was likely an entity and

TABLE 1. Four Mayo Clinic Patients With Cushing Syndrome and Bilateral Small Pigmented Adrenocortical Nodules

Case (Year)	Sex	Age, y	Suspected cause	Gross Description		Original pathologic diagnosis
				Surgical	Pathologic	
1 (1975)	F	19	Nodular adrenal hyperplasia	Uniformly slightly enlarged	Right, 3.2 g; left, 3.8 g	None
2 (1979)	F	21	Adrenal adenoma vs. bilateral ACTH-independent hyperplasia vs. ectopic ACTH production	Marbled black discoloration with diffuse fine nodularity	Right, 2.3 g; left, 2.5 g; both glands were similar in size and appearance, with a marbled black discoloration and a diffuse, fine nodularity	Bilateral micronodular disease
3 (1980)	M	12	Primary micronodular hyperplasia	Consistent with primary micronodular hyperplasia	Right, 4.9; left, 4.3 g; surfaces were variegated from numerous slightly protruding nodules; black nodules were also seen on the cut surface; he intervening cortex was atrophic	Bilateral micronodular disease
4 (1953)	M	11	?Adrenal adenoma	Right adrenal: diffuse, dark, colored nodules (2–3 mm) throughout. Lt adrenal: similar to Right adrenal, for one 1-cm adenoma and numerous small adenomas	Right, 2.5 g; left, 6.3 g; multiple dark brown adenomas varied in size from microscopic except to 6 mm (Right) and to 1.8 cm (Left); the cortex between the nodules was atrophic	Cortical adenomatosis

ACTH: corticotropin.

TABLE 2. Titles in the Medical Literature in 1983 for the Bilateral Adrenal Pathologic Findings

Author	Name
Chute et al. (1949) [3]	Bilateral nodular hyperplasia of adrenal cortex
Rose et al. (1952) [4]	Bilateral adrenal nodular cortical hyperplasia
Kracht and Tam (1960) [5]	Bilateral small-node adenomatosis
Mosier et al. (1960) [6]	Multinodular adrenal glands
Levin (1966) [7]	Bilateral adenomatous adrenal hyperplasia
Meador et al. (1967) [8]	Primary adrenocortical nodular dysplasia
Tucker et al. (1969) [9]	Nodular adrenal hyperplasia
De Gennes et al. (1970) [10]	Adrenocortical polymicroadenomatosis
Ruder et al. (1974) [11]	Micronodular adrenal disease
Schweizer-Cagianut et al. (1980) [2]	Primary adrenal micro-adenomatosis

that it had a genetic cause. The many names offered for the disorder offered in the 18 reports reflected the uncertainty about its nature (Table 2) [2-11].

Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease:1982

The opening and closing paragraphs of the discussion in the article reporting the adrenal findings in the four Mayo Clinic cases [12] include the following statements: The clinical and biochemical findings among our four patients were generally similar. The three examined in recent years apparently had ACTH-independent Cushing syndrome, suggesting the presence of an autonomously functioning adrenocortical neoplasm, but radiologic examination failed to uncover a tumor in any of the patients. Each patient had the same unusual and distinctive bilateral adrenal pathologic features: (1) the total adrenal weight was decreased, normal, or slightly increased; (2) the glands were riddled with small, black-brown, red, dark green, or yellow nodules, usually less than 4 mm in diameter; and (3) the extranodular cortex was atrophic and disorganized. Because the basic pathologic process in the adrenals is still not established, because the condition may be heritable, and because the relationship of the disorder to unusual, disparate, extraadrenal conditions (see later) need clarification, to proffer a definitive title for it is premature. It is necessary, however, to have an interim name for this unique adrenal pathology. A descriptive one seems best and we suggest the designation: primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD).

Does Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease have Associated Conditions?

The four Cuban siblings with PPNAD reported by Arce et al. [1] in 1978 had no other conditions. The two Swiss siblings reported by Schweizer-Cagianut et al. [2] in 1980 did have other disorders. One, aged 35, also had an eyelid "fibroma" and became hemiparetic 4 years after adrenalectomy. The other, aged 37 years, was thought to have neurofibromatosis because of skin "fibromas." Might this sibship have been exhibiting a combined syndrome? There was another odd finding in the family a third sibling who did not have Cushing syndrome died of a left atrial myxoma at age 4 years. It seemed remarkable to haply find two disorders, a manifestly rare adrenal disorder (PPNAD) and another rare condition (cardiac myxoma) (and possibly a third [neurofibromatosis]) in a sibship and there not be a connection between them.

Searching for a Patient whit Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease and Cardiac Myxoma: 1982 to April 1984

But to entertain this hypothesis seriously, it was necessary to find at least one patient with PPNAD and cardiac myxoma. The 28 patients with PPNAD were the obvious candidates for the combination, but none of them had cardiac myxoma. Review of the records of the 131 Mayo Clinic patients who had undergone bilateral or subtotal adrenalectomy for Cushing syndrome up to 1982 showed that none of them had cardiac myxoma.

I tried another approach to the search. I reviewed the approximately 500 reported cases of

cardiac myxoma, seeking case(s) that also featured Cushing syndrome; there were none. Fifty-one patients had been operated on at the Mayo Clinic for cardiac myxoma up to 1981; none of them had Cushing syndrome. Twenty-nine additional Mayo Clinic patients had died of or with cardiac myxoma as an incidental autopsy finding up to that time; none had Cushing syndrome.

Simultaneous with this search for cases with cardiac myxoma and Cushing syndrome, I studied the literature on the tumor itself and quickly learned that there were two types of the neoplasm, nonfamilial and familial, and was surprised to find that the simple distinguishing clinical and pathological features between the two had not been articulated (Table 3) [13].

Continuing the Fruitless Search

As was just mentioned, the Cushing syndrome had not occurred in the 29 Mayo Clinic cases in which cardiac myxoma had been found at autopsy. A review of the pathologic diagnoses in the cases revealed one in which, among 15 other major and minor diagnoses, there was that of "multiple cortical (adrenal) adenomas." The gross description of the glands was: "There are multiple cortical nodules in both adrenals. These are of a yellowish color, but contain some brown and black dots." The bilaterality and color of the nodules were reminiscent of PPNAD. There was no mention of cytoplasmic pigment or of the bizarre cytologic features typical of PPNAD, however; apparently the lesions were small standard adenomas.

Finding the Crucial Case: April 1984

At this point, I had exhausted all the categories of cases that I could think of to search for the PPNAD/ cardiac myxoma combination and had not found a case. In a desperate effort to complete what had been a time-consuming and psychically draining experience before fi nally abandoning the search, I felt obliged to review the adrenal microscopic slides in the 29 autopsy cases. The microscopic slides arrived for study on April 24, 1982. What emotions I felt as I looked at those of the case of "multiple cortical adenomas," and immediately recognized that the patient had PPNAD (Fig. 1B, C, D). At that moment the PPNAD and the cardiac myxoma combination became a reality to me and existed: it never crossed my mind for a moment that the concurrence of the two conditions might have been simply the chance occurrence of two rare disorders in the same patient.

It was surely not accidental that the cardiac myxoma in the case had been attached in the left atrium at the junc-tion of the septum and posterior wall (Fig. 1E), not the fossa ovalis, the usual site for the sporadic neoplasm. There was no mention the Cushing syndrome in the clinical abstract in the autopsy protocol, which was surprising; PPNAD had been functional in all the cases that I had identified up to then. The incongruity was partially explained when I found Crooke changes, telltale signs of hypercortisolemia, in the ACTH cells in the patient's anterior pituitary gland.

The formal clinical record was a revelation. I went through it with mounting excitement and almost disbelief. The medical resident who initially saw the patient noted an unusual skin finding: "deeply pigmented moles cover most of body" (Fig. 2A). The finding was repeated elsewhere: "Pale, tranquil with numerous nevi also (on) mouth/lips"; "she looks pale, somewhat puffy, numerous pigmented nevi"; "many pigmented moles"; "myxomatous mammary fibroadenoma." As I read these observa-

TABLE 3. Differences Between Nonfamilial and Familial Cardiac Myxoma

Featur e	Nonfamilial	Familial
Number	Single	Multiple
Location	Left atrium, attached to fossa ovalis	Any chamber, any site of attachment
Age	Sixth decade	Third decade
Recurrence	No	Yes
Associations*	No	Yes

*Lentigines, breast and skin myxomas, PPNAD, large-cell calcifying Sertoli cell tumor.

tions, I had the eerie feeling that I was reading the description of an unrecognized syndrome-in a medical record, not in a scientific article. It seemed almost impossible (statistically) that all the patient's conditions -PPNAD, unusually situated or multiple cardiac myxomas, numerous pigmented moles, and a myxomatous mammary fibroadenoma- could be encountered together in the particular circumstances in which they had been found and the events be unconnected. They must all be related; they must constitute a syndrome. The search that I was embarked on had to be expanded to include patients with at least two of the following conditions: PPNAD, cardiac myxoma, pigmented-skin spots, and myxomatous breast tumor.

Familial Case of the Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease-Myxoma Combination: June 1982

In June 1982, less than 2 months later, I was alerted to a case sent to a colleague for his opinion. It concerned a 26-year-old woman who had a hysterectomy for a uterine myxoma. Four right atrial myxomas were found during the preoperative evaluation. In addition, the patient had a past history of bilateral adrenalectomy for Cushing syndrome. I obtained the adrenal slides; they showed PP-NAD. Enquiry revealed that the patient's sister also had bi-lateral adrenalectomy for Cushing syndrome, and she also had PPNAD. I established contact with her in January 1983 only to learn that she had a stroke because of embolization of a cardiac myxoma the previous month. I also learned that she had facial pigmented skin spots, with involvement of the vermilion border of the lips and the conjunctiva at the lacrimal caruncle, and had excisions of an eyelid myxoma and myxoid mammary fibroadenomas.

Late in 1982, Schweizer-Cagianut et al. [14] reported that their previously described patient [2] with PPNAD and hemiparesis died at age 36 years. At autopsy, a left atrial myxoma was found. The histologic features of the patient's skin nodules were reported to be similar to that of the cardiac tumor. Multiple whitish nodules, microscopically benign myxomatous fibroadenomas, were present in both of the patient's breasts. She also had finely freckled pigmentation around the mouth and on the lips. The clinical description of the patient's brother's skin lesions (initially

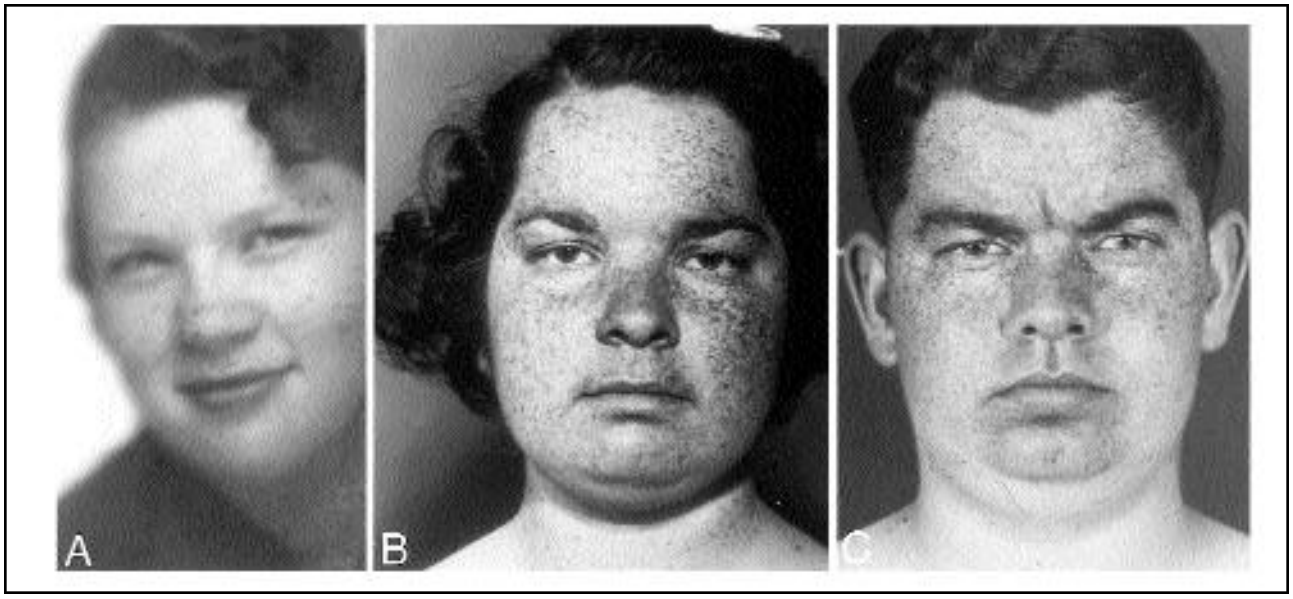


FIGURE 2.A. Index patient of the complex. Enlargement of a portion of a family photograph showing `spotty facial pigmentation when the patient was 17 years old. **B and C.** Fraternal twins with Carney complex. Both patients show a myriad of pigmented spots on face and neck, and a puffy facies with double chin.

interpreted as neurofibromatosis) was amended to indicate that there were multiple skin nodules on his chest, especially around the nipples, on the back, in the left axilla, and on the eyelids, and dark pigmented freckles around the mouth and on the lips.

Selection of the Term "The Complex"

I needed a shorthand way of referring to the Cushing syndrome-cardiac myxoma-pigmented skin spot disorder. I chose the term "the complex," using "complex" in the sense of a whole made up of complicated interrelated parts (see later). Meantime, two acronyms had appeared, each coined for single cases of the complex in which the cutaneous manifestations were striking: NAME (nevi, atrial myxoma, myxoid neurofibroma, and ephelides) [15] and LAMB (lentigines, atrial myxoma, mucocutaneous myxomas, and blue nevi) [16]. Neither patient apparently showed the adrenal involvement that had led me to the syndrome.

Large-cell Calcifying Sertoli Cell Tumor: February 1984

Around this time, I remembered reading about an unusual testicular tumor that had remarkable associations. The article was the original description of large-cell calcifying Sertoli cell tumor (LCCSCT) [17] published in 1980. It described a series of conditions associated with this rare tumor suggesting that LCCSCT was almost certainly another component of the complex (Table 4). Two of the affected patients who will be mentioned later were brothers who had died of cardiac myxoma at a young age.

Significance of Unusual Cardiac Myxomas: March 1984

Earlier in the study, when I realized the significance of unusually located and multiple cardiac myxomas (Table 3), I searched the literature for similar cases and found among others that of a 24-year-old woman with left atrial and ventricular myxomas [18]. In response to my enquiry, Dr. Gary D. Beauchamp confirmed that the patient had black facial spots, including involvement of the lacrimal caruncle (Fig. 1F). She also had myxomatous lesions of an eyelid and both breasts. She had the complex. Dr. Beauchamp introduced me to the patient; she in turn introduced me to her seven siblings and parents. I obtained their medical records, histologic slides, and photographs. Facial and other pigmented spots had occurred in two consecutive generations, raising the possibility that the complex was transmitted as a dominant trait. Histologic slides of biopsy specimens of all family with the skin spots and other cutaneous lesions (myxomas) were available, except from the index patient's mother.

Dominant Inheritance of the Complez: October 1984

The family agreed to participate in a study of

TABLE 4. Conditions Accompanying LCCSCT in 4 Patients (Modi oed from Proppe and Scully [17])*

Patient	Age, y	LCCSCT	Other conditions
5	10	Bilateral, multifocal	Cardiac myxoma (left ventricle); adrenal cortical hyperplasia bilateral †; pigmented skin spots and blue nevi ‡
6	16	Bilateral, multifocal	Cardiac myxoma (left atrium); pigmented skin spots and blue nevi ‡
7	11	Bilateral, multifocal	Adrenal cortical hyperplasia, bilaterally †§
8	11	Single	Growth hormone-producing pituitary adenoma

*LCCSCT, large-cell calcifying Sertoli Cell Tumor.
† Primary pigmented nodular adrenal disease, on review.
‡ Not mentioned in original report.
§ Developed right atrial myxoma at age 31 years.

their pigmentary disorder and undergo examination for cardiac myxoma. Photographs of the mother showed that she had dark facial and labial pigmented spots. Despite the photographic evidence, she became the most important member of the family for me to actually see because she apparently was the first member of the family to manifest the mutated gene and none of her pigmented skin spots had been biopsied.

The late Dr. Hymie Gordon, a colleague, and I met the family at Dr. Beauchamp's office in Kansas City on October 24, 1984. To my chagrin, the mother declined to attend at the last moment. (I eventually did meet her in 1990 and confirmed that she had the classic facial pigmentation of the complex.) However, a 2-year-old member of the third generation was present, the daughter of an affected member of the second generation and she had the typical facial and labial pigmented spots of the complex. Thus, three generations of the family exhibited spotty skin pigmentation in a pattern consistent with dominant inheritance (Fig. 1F). Three also had cutaneous myxomas, one had cardiac myxoma, and one had acromegaly caused by a growth hormone-producing pituitary adenoma. Echocardiograms of all the family members were normal. (The index patient developed PPNAD-associated Cushing syndrome in 1985 and acromegaly in 1995.)

Implications of Dominant Inheritance

As I mentally contemplated the article that would de-scribe dominant inheritance of the complex in the family [19], it seemed important to get further information about the family of the brothers with LCCSCT mentioned earlier who died of cardiac myxoma. If the disorder was a dominant trait, one of their parents must have the complex. Had that parent expressed the disorder? Was the affected parent alive? If neither parent had manifested the condition, it would be important to include this information about penetrance of the trait in an article describing inheritance of the complex.

Dr. Robert B. Scully, Massachusetts General Hospital, Boston, generously shared correspondence related to the deceased boys with me. This led to discovery that pigmented skin lesions, including blue nevi, had been excised from both. The correspondence also provided the father's name, a 1966 home address, his age (he was past retirement age in 1983), and his employer's name. The family had moved and its whereabouts were unknown. The father's employer forwarded a letter from me to him. Within a week I received a phone call from the father.

He was 71 years old, and his wife was 57 years. They had only two children, the deceased boys. Both parents were apparently healthy. Neither had Cushing syndrome or cardiac myxoma, and the father had not had testicular tumors. He had pigmented skin lesions excised but these were seborrheic keratoses microscopically. Photographs did not show obvious facial pigmentation in either parent. After I explained my suspicions regarding the possibility of a familial disorder to them, I arranged to meet at their local hospital in Eugene, Oregon, in December 1984.

While we were introducing ourselves, I scrutinized the father's face and lips for subtle pigmented spots that might not have shown up in the photographs, but none were present.

Then I turned to his wife and immediately realized it was she who was affected! She had fading pigmented spots on her face and lips, and later I saw that a lacrimal caruncle was also affected. These findings took me completely aback because the photograph she had sent me showed a perfectly clear complexion; her pigmented facial spots had been carefully camouflaged for the studio photograph. From this experience, I learned not to rely on just one photograph, particularly one taken by a professional photographer; family photographs are often the most revealing. An echocardiogram performed later in the morning showed that she had a left atrial mass (which proved to be a myxoma). I was not sure how she would react to this potentially devastating news. She said nothing, but a few tears trickled down her cheeks. As we parted, she gave me a hug.

The Complex of Mixomas, Spotty Pigmentation, and Endocrine Overactivity: July 1985

By the end of 1984, I had collected 40 cases with combinations of cardiac myxoma, spotty skin pig-

mentation, skin myxomas, PPNAD, mammary myxoid fibroadenoma, large-cell Sertoli cell tumor of the testis, and growth hormone-producing pituitary adenoma. Through communication with the authors I had obtained additional information relevant to the complex in 21 of the 36 reported cases. The discussion in the article on the series began with the following passage [20]:

The data we have assembled constitute a web of circumstantial evidence that points to a causal connection between several apparently different and unrelated conditions. The conditions included myxomatous masses (cardiac myxoma, cutaneous myxoma, and mammary myxoid fibroadenoma), spotty pigmented lesions of the skin (lentigines and blue nevi), and endocrine disorders (primary pigmented nodular adrenocortical disease, various testicular tumors [large-cell calcifying Sertoli cell, Leydig cell tumor, and adrenocortical rest types], and growth-hormone pituitary adenoma). No patient had all of these conditions; the maximum number of conditions present together was five, and this was observed in only two patients. But each of these is rare, so that the occurrence of variable combinations of even two of them in as many as 40 patients is extremely unlikely to be caused by chance alone.

Nomenclature and Eponyms

Since 1982, I have referred to the combination of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine tumors, and schwannomas as "the complex." There were several reasons for this, one of which was mentioned earlier. In 1977, I described another multitumoral syndrome comprised of gastric epithelioid leiomyosarcoma, functioning extraadrenal paraganglioma, and pulmonary chondroma, [21] which I called the triad of gastric leiomyosarcoma, etc. I decided to title the condition "the triad" of such and such rather than "the syndrome" of such and such, because the disorder was unusual among multitumoral syndromes in not being familial and also "triad" was the more colorful of the two descriptors. I sought through the title to set the disorder apart from other syndromes. In time, two eponymic designations for the condition appeared, Carney triad and Carney syndrome.

When it came time to name the myxoma–spotty skin pigmentation–PPNAD disorder, to avoid confusion with previously used titles, I decided to refer to it as "the complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity". Subsequently, the disorder has been referred to as the Carney complex (usually) and as the Carney syndrome (occasionally). In 1985, I had no idea that in 2002 a third syndrome I encountered would need a name [22].

The following was written [23]:

Medical eponyms not only serve to perpetuate the memory of outstanding medical practitioners but also are a useful shorthand notation when communicating about complex medical problems. Eponyms also serve as mnemonics and add color to medical writing.

I will not comment on the authors' first statement, but I agree with the other three.

Final Follow-up: 2002

The index patient of PPNAD, the 19-year-old woman described at the beginning of this article, is alive at age 47 years. She has not developed any other component of the complex; results of a recent echocardiogram are normal. She presumably is a sporadic case of PPNAD.

None of the primary relatives of the 33-year-old index patient of the comfplex have manifested the disorder. The patient presumably was a sporadic case of the syndrome.

The First Cases of the Carney Complex: 1939

To the best of my knowledge, the first documented cases of the Carney complex were seen at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota in August 1939 [24]. The patients, a brother and sister who were 17-year-old fraternal twins, had Cushing syndrome and spotty skin pigmentation (Fig. 2). W. F. Young Jr, M.D., a colleague, found their photographs (Fig. 2B, C) in the Department of Endocrinology and brought the cases to my attention in 1986. I had failed to find them in the Mayo files because my search was limited to patients with specimens from both adrenal glands. Adrenal tissue was obtained from only one of the twins, and that was from a unilateral biopsy.

References

1. Arce B, Licea M, Hung S, et al.: Familial Cushing's syndrome. Acta Endocrinol 1978; 87: 139-47.
2. Schweizer -Cagianut M, Froesch ER, Hedinger Chr.: Familial Cushing's syndrome with primary adrenocortical microadenomatosis (primary adrenocortical nodular dysplasia). Acta Endocrinol 1980; 94: 529-35.
3. Chute AL, Robinson GC, Donoghue WL.: Cushing's syndrome in children. J. Pediatr 1949; 34: 20–39.
4. Rose EK, Enterline HT, Rhoads JE, et al.: Adrenal cortical hyper- function in childhood: Report of a case with adrenocortical hyperplasia and testicular adrenal rests. Pediatrics 1952; 9: 475–83.
5. Kracht J, Tamm J.: Bilaterale kleinknotige adenomatose der Neben-nierenrinde bei Cushing-syndrom. Virchows Arch (Pathol Anat) 1960; 20: 632-40.
6. Mosier HD, Flynn PJ, Will DW, et al.: Cushing syndrome with multinodular adrenal glands. J Clin Endocrinol Metab 1960; 20: 632–40.
7. Levin ME.: The development of bilateral adenomatous adrenal hyperplasia in a case of Cushing's syndrome of eighteen years' duration. Am J Med 1966; 40: 318-24.
8. Meador CK, Bowdoin B, Owen WC jr, et al.: Primary adrenocortical nodular dysplasia: A rare cause of Cushing's syndrome. J. Clin Endocrinol Metab 1967; 27: 1255-63.
9. Tucker H StG, Jr, Estep HL, Hume DM, et al.: Cushing's syndrome with nodular adrenal hyperplasia. Trans Am Clin Climatol Assoc 1968; 80: 37-49.
10. De Gennes JL, Garnier H. Calmette M, et al.: Etude clinique, bi-ologique et histologique d'un cas exemplaire de polymicroadénomatose corticosurrénale. Ann Endocrinol (Paris) 1970: 31: 1022-38.
11. Ruder HJ, Loriaux DL, Lipsett MD.: Severe osteopenia in young adults associated with Cushing's syndrome due to micronodular adrenal disease. J Clin Endocrinol Metab 1974; 39: 1138-47.
12. Shenoy BV, Carpenter PC, Carney JA: Bilateral primary pigmented nodular adrenocortical disease: Rare cause of the Cushing syndrome. Am J Surg Pathol 1984; 8: 335–44.
13. Carney JA: Differences between nonfamilial and familial cardiac myxoma. Am J Surg Pathol 1985; 9: 53–5.
14. Schweizer-Cagianut, Salomon F, Hedinger Chr E: Primary adrenocortical nodular dysplasia with Cushing's syndrome and cardiac myxomas: a peculiar familial disease. Virchows Arch (Pathol Anat) 1982; 397: 183–92.
15. Atherton DJ, Pitcher DW, Wells RS, et al.: A syndrome of various cutaneous pigmented lesions myxoid neurofibromata and atrial myxoma: the NAME syndrome. Brit J Dermatol 1980; 103: 421–9.
16. Rhodes AR, Silverman RA, Harrist TJ, et al.: Mucocutaneous lentigines, cardiomucocutaneous myxomas and multiple blue nevi: the "LAMB" syndrome. J Am Acad Dermatol 1984; 10: 72–82.
17. Proppe KH, Scully RB.: Large-cell calcifying Sertoli cell tumor of the testis. Am J Clin Pathol 1980; 74: 607–19.
18. Morgan DL, Palazola J, Reed, et al.: Left heart myxomas. Am J Car-diol 1977; 40: 611–4.
19. Carney JA, Hruska L, Beauchamp GD, et al.: Dominant inheritance of the complex of myxomas, spotty pigmentation and endocrine overactivity. Mayo Clin Proc 1986: 61: 165–72.
20. Carney JA, Gordon H, Carpenter, et al.: The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. Medicine (Balti-more) 1985; 64: 270–83.
21. Carney JA, Sheps SG, Go VL W, et al.: The triad of gastric leiomyo-sarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma. N Engl J Med 1977: 296: 1517–8.
22. Carney JA, Stratakis CA: Familial paraganglioma and gastric stromal sarcoma: a new syndrome distinct from the Carney triad. Am J Med Genet 2002; 108: 132–9.
23. Östör AG, Phillips GE: Immortal women. Essays in medical eponyms: part 1. Am J Surg Pathol 1999; 23: 495–501.
24. Young WF Jr, Carney JA, Musa BV, et al.: Familial Cushing's syndrome due to primary pigmented nodular adrenocortical disease: Reinvestigation 50 years later. N Engl J Med 1989; 321: 1659-64.

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol 40 • No. 4
Copyright © 2003 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo

INFORME DEL CACDDI-FASEN

PÁGINAS PARA RELEER:

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

Tercera Parte:

Establecimos para nosotros un programa de trabajo muy arduo. Llegábamos al laboratorio alrededor de las 8 de la mañana y enseguida comenzábamos con las captaciones, la distribución de las muestras de orina en alícuotas, entrevistábamos a nuevos pacientes para incorporarlos al protocolo, obteníamos muestras de sangre, saludábamos y hablábamos con nuestros visitantes y trabajábamos sobre la pila de datos que se acumulaban rápidamente. Desarrollamos un tipo de almuerzos rápidos para evitar el relajamiento y modorra postprandial. Volvíamos al hotel alrededor de las seis de la tarde, cenábamos temprano y luego dedicábamos la mayoría de las noches a trabajar sobre los datos obtenidos y a planificar nuevas observaciones.

Tuvimos un flujo permanente de visitantes. De Montevideo vineron Cerviño, Mussio-Fournier y Morato, que luego viajó a Boston para estar en nuestra clínica; Reforzo y muchos otros. Nuestras actividades fueron frecuentemente recopiladas por un excelente periódico local, Los Andes, y de vez en cuando por la prensa nacional de Buenos Aires.

La cooperación de los sujetos seleccionados para los estudios fue óptima. Muchas veces se les pidió que recojan orina por varios días y muy raramente dudamos de que no lo hubieran hecho correctamente. Varios pacientes tuvieron que volver diariamente para mediciones secuenciadas. La novedad del emprendimiento, la cobertura periodística y el conocimiento de que nuestra tarea era patrocinada y sancionada por el gobierno contribuyó, sin duda alguna, a la confianza que los pacientes depositaron sobre nuestros protocolos experimentales.

Nosotros arribamos a Mendoza con una serie de planes básicos de estudios, pero muchos otros fueron desarrollados durante el curso de nuestra estadía, en base a los hallazgos que adicionalmente surgieron de algunas líneas de observación. Entre ellos, estuvieron las mediciones de la captación y "turnover" de yodo, los efectos de suplementos yódicos, durante tiempos cortos y largos, sobre la función de la glándula tiroides y el balance de yodo, asi como los efectos de la suplementación con tiroxina y algunas mediciones en cretinos. Los conteos de radioyodo estuvieron ensamblados con los ensayos de excreción de yodo estable.

Hemos trabajado duro, pero no todo el tiempo. Las cenas fueron, generalmente, un intercambio placentero con amigos. Ocasionalmente tuvimos fiestas que nos brindaron la posibilidad de gozar de la música y la danza folclórica regional, de los asados, de visitas a lugares como Potrerillos y, en numerosas oportunidades, de probar los vinos más finos directamente desde las cubas de las bodegas que hicieron famosa a Mendoza, tales como Trapiche y Tupungato.

Cuando la recolección de datos llegó a su fin, nos juntamos con un grupo de funcionarios del gobierno local y de la Universidad y nos fuimos de visita por tres días a Bariloche en avión, donde, a pesar de copiosas lluvias, vimos hermosos lagos, vegetación y montañas. Allí tuvimos un almuerzo con el controvertido Dr. Richter, quien era el director de la investigación nuclear en Argentina e insinuaba, en forma poco clara, estar perfeccionando un proceso totalmente nuevo para la fusión atómica. Aquellos de nosotros, que luego fuimos a Buenos Aires, no olvidaremos nunca la caída hacia la superficie del lago del avión sobrecargado una vez que despegó de la pista, ni tampoco la puerta que se abrió en la mitad del vuelo, mientras cruzábamos el desierto patagónico, que nos hizo temer por nuestros datos y las miles de muestras de orina que llevábamos.

Dra. María del Carmen Silva-Croome Dr. Hugo Niepomniszcze
Coordinadores del CACDDI-FASEN

CONTINUARÁ

Monitoreo de DDI en la Cordillera Rionegrina (2000).

Spegni, Susana *; Bálsamo, Norma **; Morana, F. ***; Bernatené, D. °; Silva-Croome, María del Carmen °°; Gauna, Alicia °°; Sartorio, G. °°° y Niepomniszcze, H.°°°°*

* Médica Responsable de la Coordinación Local, ** Bioquímica de la Provincia de Río Negro, *** Médico de Bariloche, ° Bioquímico del Hospital San Juan de Dios de Buenos Aires, °° Médicas de Planta y °°° Director Bioquímico de la División Endocrinología del Hospital "Ramos Mejía" 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 793 niños de ambos sexos fue estudiado en este monitoreo de bocio endémico en dos localidades de la Provincia de Río Negro, San Carlos de Bariloche y El Bolsón, situadas al pié de la Cordillera de los Andes. En la primera se palpó el cuello de 443 alumnos de escolaridad primaria, mientras que se hizo lo mismo con otros 350 de El Bolsón. La edad de los escolares osciló entre 6 y 15 años. La palpación tiroidea fue hecha por el conjunto de los médicos participantes. Sin embargo, con la finalidad de aunar criterios con lo realizado previamente [1-5], se tomó como única referencia la palpación de H.N., que se llevó a cabo en la totalidad de los niños estudiados. 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 (397 de Bariloche y 330 de El Bolsón). Se midió también el contenido de yodo en 405 muestras de sal de consumo hogareño de San Carlos de Bariloche y en 222 de El Bolsón. El examen palpatorio de los niños reveló solamente la existencia de bocio grado 1. La prevalencia de bocio en la Ciudad de San Carlos de Bariloche fue de 4,3%, mientras que El Bolsón registró un valor de 8%. Los niveles de yoduria tuvieron, en Bariloche, una $\bar{x}$ de 161µg/L y una mediana de 134µg/L; mientras que en El Bolsón la $\bar{x}$ fue de 186,5µg/L y la mediana de 163µg/L. El contenido de yodo de las sales que trajeron de sus hogares el 44,1% de la población escolar de El Bolsón y el 79% de San Carlos de Bariloche fue >15mg/Kg. No se encontraron diferencias en las yodurias de los escolares con o sin bocio, ni tampoco relación alguna con el tipo de sal consumida. Por estos resultados, se deduce que en las localidades estudiadas no existiría actualmente déficit de yodo. Concluimos que no hay bocio endémico en Bariloche aunque persiste una endemia leve en El Bolsón, a pesar de que las yodurias están dentro de los límites recomendables por la ICCIDD. Tal vez, esta mayor prevalencia de bocio esté relacionada con el pauperismo de la mayoría de los niños evaluados, que habitualmente se asocia a carencias alimentarias. De cualquier manera, también debería considerarse la posibilidad que la ingestión de sustancias bociogénicas pudieran contribuir a la leve endemia observada en la población escolar de El Bolsón.

Introducción

Este monitoreo fue llevado a cabo dentro del marco del Programa del CACDDI patrocinado por Química Montpellier S.A., habiéndose realizado en dos localidades de la Provincia de Río Negro situadas al pie de la Cordillera de los Andes, San Carlos de Bariloche y El Bolsón, los días 14 y 15 de septiem-

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.

bre de 2000. Contó con la participación, en "terreno", de dos médicos (S.S. y F.M.) y una bioquímica (N.B.), como representantes locales, mientras que del CACDDI fueron, desde Buenos Aires, tres médicos (M.C.S.C., A.G. y H.N.) y una técnica [1]. Sus tareas fueron similares a las realizadas en los relevamientos anteriores [1,2,3,4,5].

Material y Métodos

Se palpó el cuello de 443 niños de la Escuela Nro.328 "Evelia Agundez de Calderón" de San Carlos de Bariloche y de 350 de la Escuela Nro. 271 de El Bolsón. En ambas escuelas la mitad de los alumnos fueron varones y la otra mitad mujeres.

Las palpaciones fueron realizadas por el conjunto de los médicos participantes. Sin embargo, al igual que en relevamientos anteriores [3,4,5], 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].

En la fig.1 se observa la distribución por edades y por sexo de los alumnos estudiados en las dos localidades. Se determinó la yoduria en muestras casuales de orina, emitidas por los niños una vez que fueron palpados (397 de Bariloche y 330 de El Bolsón). También se midió el contenido de yodo en la sal de consumo hogareño de 405 muestras de San Carlos de Bariloche y de 122 de El Bolsón.

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.

Resultados

La prevalencia de bocio fue de 4,3% en los alumnos de la Ciudad de San Carlos de Bariloche, mientras que El Bolsón registró un valor de 8% (Fig.2). El examen palpatorio de los niños reveló solamente la existencia de bocio grado 1. No hubo relación algu-

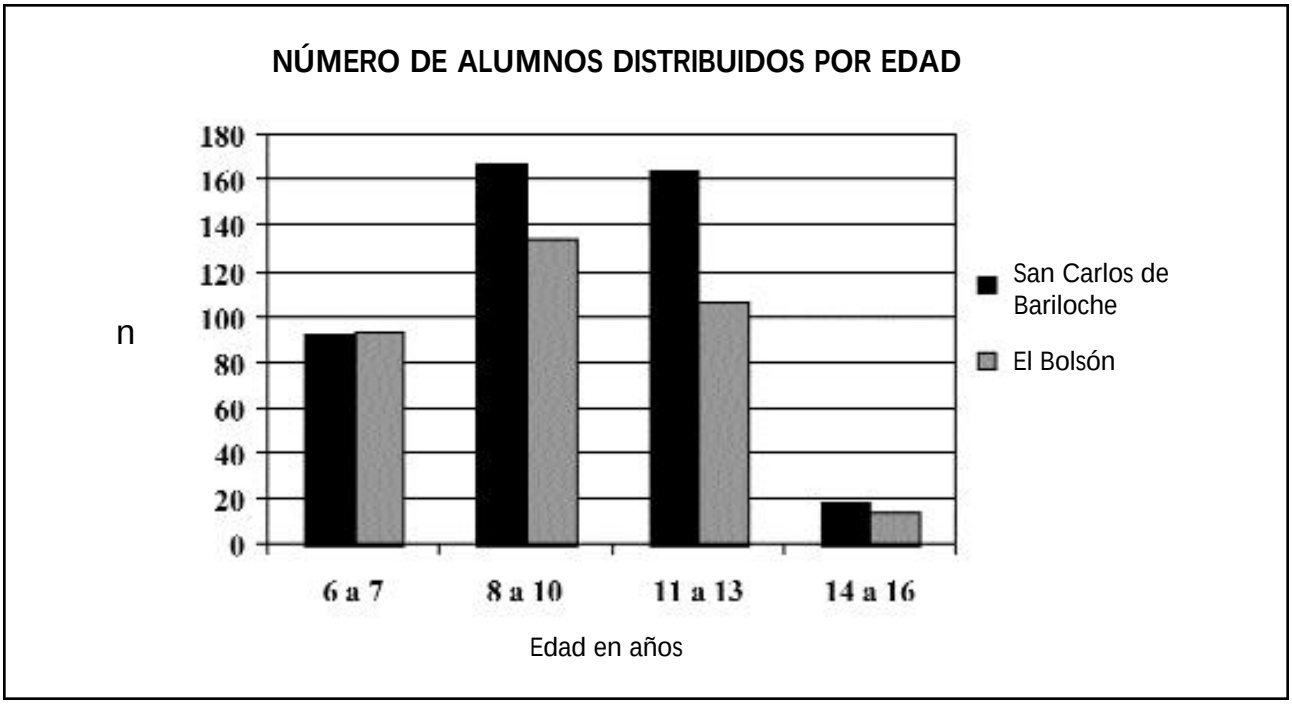


Figura 1. Distribución de alumnos por edad.

na entre la frecuencia de bocio y la edad y sexo de los alumnos.

Yodurias:

El contenido de yodo urinario de los escolares de las dos 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. Los resultados hallados se observan en la tabla 1.

Los percentilos 0.05 y 0.95 fueron de 36,1 y 333,8 para Bariloche y 49,5 y 418,9 para El Bolsón, respectivamente.

Contenido de yodo en la sal de consumo hogareño:

Se midió el contenido de yodo en 405 muestras de sal de San Carlos de Bariloche y en 222 de El Bolsón. Se observó que alrededor del 80% de las muestras de Bariloche contuvieron >15mg de yodo por Kg de sal. Sin embargo, la situación de El Bolsón fue muy diferente, dado que menos de la mitad de las muestras pudo superar la mencionada línea de corte recomendada por la ICCIDD [6]. Aparentemente, una gran parte de la población carenciada de El Bolsón consume sal suelta, a pesar de que sea de marca comercial conocida. Aún así, 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, mientras que en las tablas 3 y 4 puede observarse el contenido de yodo en cada marca de sal.

Discusión

Los habitantes de las regiones cordilleranas de la República Argentina, con anterioridad a la profilaxis con sal yodada, fueron aquellos que con más severidad padecieron los efectos de la deficiencia ambiental de yodo. Si bien no hay datos sobre estudios realizados en la zona de la cordillera rionegrina, es dable suponer que sus pobladores sufrieron el problema en magnitudes equivalentes a las de sus vecinos de Neuquén, Chubut o Mendoza, donde sí fue posible constatar una muy elevada prevalencia de bocio endémico [7,8]. Es evidente que luego de 3 décadas de yodación compulsiva de la sal de consumo humano y animal la deficiencia de yodo se

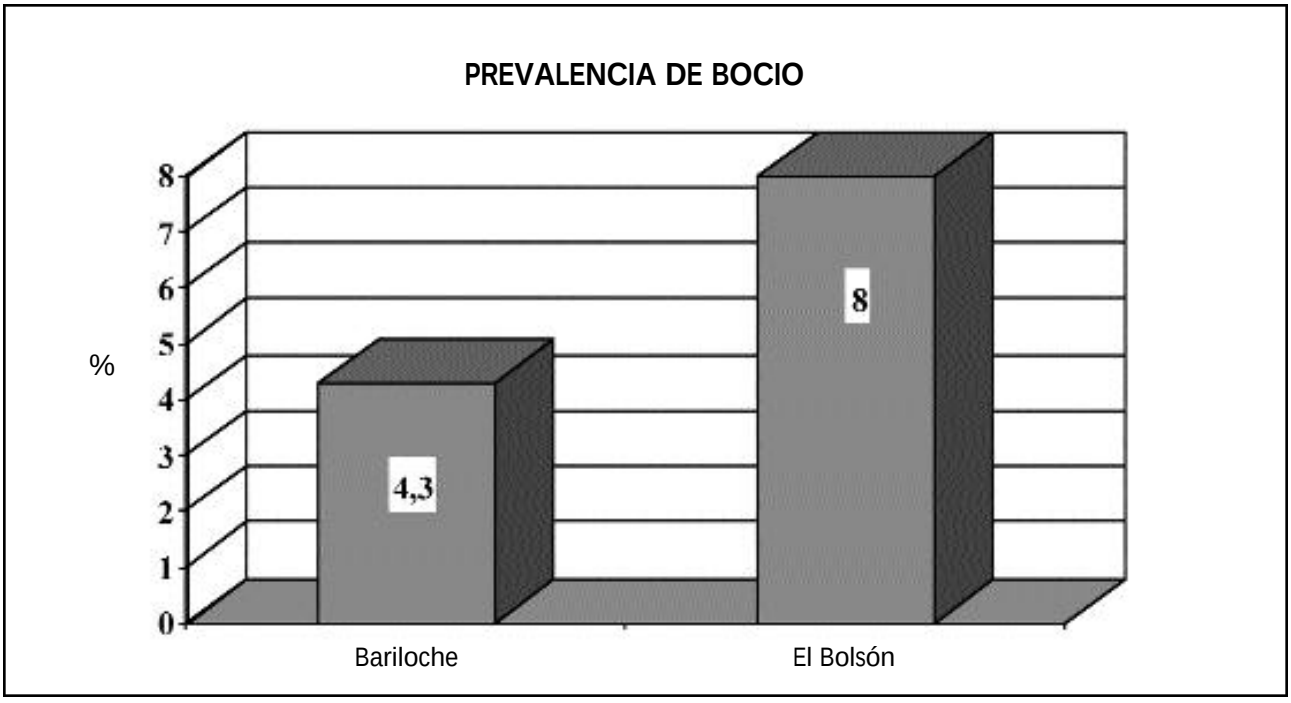


Figura 2. Prevalencia de bocio en la Cordillera Rionegrina.

Tabla 1
YODURIAS EN LA CORDILLERA RIONEGRINA
(μg/L)

LOCALIDAD	$\bar{x}$ ± D.S.	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	n
BARILOCHE	161±116	134	25	936	397
EL BOLSÓN	186,5±117	163	25	696	330

Tabla 2
Consumo de la sal según la marca

Marca	Localidad	
	San Carlos de Bariloche	*El Bolsón*
Celusal®	13,8 %	11,7 %
Dos Anclas®	66,7 %	43,7 %
Colosal®	18,5 %	42,3 %
Rinsal®	0 %	0,5 %
?	1 %	1,8 %

revirtió. La ciudad de San Carlos de Bariloche arrojó un porcentaje de bocio que está dentro de lo que es considerado normal, es decir, una zona libre de bocio endémico. No obstante, la localidad de El Bolsón, lindera con la Provincia de Chubut, tiene un 8% de bocio, cifra que está comprendida dentro de la endemia leve. Prima fascie , uno podría inclinarse a justificar este hallazgo por la insuficiente yodación de las muestras de sal que los alumnos trajeron desde sus hogares. Sin embargo, el hecho que esos niños hayan tenido yodurias normales, aún ligeramente más altas que las de los escolares de Bariloche, descarta por completo que la mayor prevalencia de bocio observada pudiese ser atribuida a un déficit parcial de yodo. De esta manera, surge el interrogante de cuáles son las causas de tal hallazgo. Una de ellas podría ser el pauperismo de la mayoría de los niños evaluados, que habitualmente se asocia a carencias alimentarias, mientras que otra, tal vez, esté eventualmente ligada a la ingestión de sustancias bociogénicas, ya sea por el agua de bebida o por alimentos autóctonos de la región.

Una consideración especial requiere el hecho de que una de las marcas comerciales de sal (**Dos Anclas®**), cuyo contenido en yodo fue relativamente apropiado en las múltiples determinaciones llevadas a cabo en otros relevamientos [1-5], incluyendo el actual de San Carlos de Bariloche, haya sido tan deficitaria en la localidad de El Bolsón. Probablemente, esto sea debido a que un número importante de familias carenciadas suele comprar la

Tabla 3
Contenido de yodo en la sal - San Carlos de Bariloche

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
Celusal®	30,8 ± 9,4	5,4	30,5	0,0 - 58,7	56
Dos Anclas®	27,0 ± 15,2	24,4	56,3	0,0 - 75,1	270
Colosal®	29,9 ± 17,6	21,3	58,9	2,4 - 72,7	75
?	35,5 ± 3,5	0	9,9	33,1 - 40,6	4

Tabla 4
Contenido de yodo en la sal - El Bolsón

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
Celusal®	27,6 ± 13,3	15,4	48,2	0,0 - 51,2	26
Dos Anclas®	8,5 ± 12,7	75,3	149,4	0,0 - 47,1	97
Colosal®	20 ± 15,4	47,9	77	0,0 - 69,8	94
Rinsal®	21,9	0	-	-	1
?	8,9 ± 10,3	50	115,8	0,0 - 20,2	4

sal, en forma suelta, en los negocios minoristas de la zona. Es factible que la sal **Colosal®** también haya tenido parcialmente estos inconvenientes. Cabe señalar que cuando la sal yodada está expuesta en forma prolongada al aire libre, sin la cobertura de un envase cerrado, la volatilidad del yodo es mayor, aunque éste se encuentre en la forma de yodato de potasio, que es más estable que el yoduro de potasio. Dado que la mayoría de los escolares carenciados suele almorzar en la escuela, donde la sal administrada tiene buena calidad de yodación, es que estos niños logran alcanzar yodurias satisfactorias. En síntesis, podemos concluir que los habitantes de las localidades situadas en la cordillera rionegrina tienen una prevalencia de bocio que oscila entre la normalidad y la endemia leve.

Agradecimientos

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. Escalada, L.F. y col. Monitoreo de DDI en la Provincia de Misiones (2000). Rev. Argent. Endocrinol. Metab., 40: 44, 2003
5. Morando, J.D. y col. Monitoreo de DDI en la Provincia de San Juan (2000). Rev. Argent. Endocrinol. Metab., 40:190, 2003
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. Watanabe, T. y col. Iodized oil in the prophylaxis of endemic goiter in Argentina. En: Endemic Goiter and Cretinism: Continuing Threats to World Health: Dunn J.T. & Medeiros Neto G.A. (eds.). Pan American Health Organization, Scientific Publication No. 292, Washington D.C., USA, 1974, pág. 231
8. Niepomniszcze, H. y Degrossi, O.J. Prophylaxis of Endemic Goiter in Argentina. En: Towards the Eradication of Endemic Goiter, Cretinism, and Iodine Deficiency: Dunn J.T., Pretell E.A., Daza C.H. & Viteri F.E. (eds.). Pan American Health Organization. Scientific Publication No.502, Washington D.C., USA, 1986, pág. 260