

TRABAJO ORIGINAL 1^{ER} PREMIO A COMUNICACIONES LIBRES ENTREGADO EN EL XIII CONGRESO DE LA SAEM

Carcinoma medular de tiroides familiar (CMTF): Primera familia descrita con CMTF asociado a la mutación Cys611T rp del protooncogen RET .

Familial Medullary Thyroid Carcinoma (FMTC): First family described
with FMTC associated to Cys611Trp mutation of proto-oncogen RET .

Fernández Gianotti, T. ¹; Fainstein Day, Patricia ¹; Russo Picasso, María Fabiana ¹; Knoblovits, P. ¹; Figari, M. ²

Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Medicina Nuclear ¹, y Servicio de Cirugía ², Hospital Italiano de Buenos Aires.

Resumen

La neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (NEM 2) es un síndrome autosómico dominante identificado en 500-1000 familias hasta la fecha. Todas las variantes de NEM 2 muestran una penetración mayor al 90% para la manifestación del carcinoma medular de tiroides, mientras que la penetración es menor y variable para el feocromocitoma (50%) y tumores paratiroides (25%). El CMTF es una variante rara dentro de NEM 2 en la que 4 o más miembros de una familia presentan evidencia de carcinoma medular de tiroides sin manifestación asociada de feocromocitoma o hiperparatiroidismo primario. En los últimos años el estudio genético del protooncogen RET en los casos índices para carcinoma medular y en sus posibles portadores se ha impuesto debido a que se ha demostrado que la tiroidectomía en los primeros 2 a 5 años de edad puede prevenir o curar el CMT inclusive antes de su expresión bioquímica (niveles basales o postestímulo de calcitonina plasmática) en NEM 2. La indicación de tiroidectomía profiláctica es menos clara en CMTF. Con respecto a las mutaciones halladas en el protooncogen RET (10q11.2) el 80-90% afectan el codón 634, y con menor frecuencia los codones 918 (10-20%), 620 (6-8%), 618 (3-5%), 611 (2-3%) y 609 (0-1%).

En este trabajo presentamos una familia portadora de una mutación heterocigota infrecuente en el protooncogen RET, Cys611Trp, (sólo un caso previo mencionado en la literatura internacional) que no fue detectada en un estudio genético previo, que presumiblemente no utilizó el método de secuenciación, en la que se discute la conducta a seguir en portadores asintomáticos.

Se plantean 2 posibles conductas en los 2 niños asintomáticos, portadores de la mutación. Tiroidectomía preventiva, o la conducta expectante hasta la expresión bioquímica. Basándonos en distintos consensos internacionales, nos inclinamos por la primera conducta.

Dirección Postal: Bioq. Tomás Fernández Gianotti. Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Medicina Nuclear. Hospital Italiano, Gascón 450. Capital Federal. Tel: 4959-0200 int: 8232/8320 - Fax: 4959-0323

E-mail: tomas.gianotti@hospitalitaliano.org.ar

Palabras clave: CMTF, Protooncogen RET, Codón 611

Key words: FMTC, Proto-oncogen RET, Codon 611

Abstract

Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2) is an autosomal dominant syndrome identified to date in 500-1000 kindreds. All variants of MEN 2 show a penetrance higher than 90% for medullary thyroid carcinoma (MTC), whilst the penetrance for pheochromocytoma (50%) and parathyroid tumors (25%) is lower and variable. Familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) is a rare variant of MEN 2, in which 4 or more members of a family have MTC without pheochromocytoma or primary hyperparathyroidism. In recent years genetic testing for the proto-oncogene RET mutations in the index case of MTC and in possible carriers has been used, because it has been demonstrated that prophylactic thyroidectomy before 2-5 years of age can prevent or cure MTC in MEN 2, even before it develops any biochemical expression (basal or post-stimulus plasmatic calcitonin levels). Prophylactic thyroidectomy is not so clearly beneficial in FMTC. Mutations in the proto-oncogene RET (10q11.2) affect codon 634 in 80-90%, and less frequently, codons 918 (10-20%), 620 (6-8%), 618 (3-5%), 611 (2-3%) and 609 (0-1%).

In this report we describe a family with an infrequent mutation in proto-oncogene RET, Cys611Trp, (only one case reported in the bibliography). This mutation had not been detected in a previous genetic study, presumably DNA sequencing was not used, and we discuss herein the clinical management of the asymptomatic carriers.

Two approaches are available for the 2 asymptomatic young carriers: 1) to perform prophylactic thyroidectomy as soon as the mutation is detected or 2) to wait for a positive result in the stimulated calcitonin test and then perform a thyroidectomy. Studies from an international consortium lead us to believe that an early prophylactic thyroidectomy is the appropriate course of action.

Introducción

La neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (NEM 2) es un síndrome autosómico dominante identificado en 500-1000 familias hasta la fecha. Todas las variantes de NEM 2 muestran una penetrancia mayor al 90% para la manifestación del carcinoma medular de tiroides, mientras que la penetración es menor y variable para el feocromocitoma (50%) y tumores paratiroides (25%). El CMFT es una variante rara dentro de NEM 2 en la que 4 o más miembros de una familia presentan evidencia de carcinoma medular de tiroides sin manifestación asociada de feocromocitoma o hiperparatiroidismo primario ¹.

En los últimos años, el estudio genético del proto-oncogen RET en los casos índices para carcinoma medular y en sus posibles portadores se ha impuesto debido a que se ha demostrado que la tiroidectomía en los primeros 2 a 5 años de edad puede prevenir o curar el CMT, inclusive antes de su expresión bioquímica (niveles basales o postestímulo de calcitonina plasmática) en NEM 2 ². La indicación de tiroidectomía profiláctica es menos clara en CMFT.

Con respecto a las mutaciones halladas en el protooncogen RET (10q11.2), el 80-90% afectan el

codón 634, y con menor frecuencia los codones 918 (10-20%), 620 (6-8%), 618 (3-5%), 611 (2-3%) y 609 (0-1%) ^{3,4}. Distintas técnicas del laboratorio de biología molecular pueden utilizarse para hallar algunas de las mutaciones descritas, pero sólo la secuenciación completa del protooncogen RET permite descartar la presencia de mutaciones.

El objetivo de este trabajo es presentar una familia portadora de una mutación heterocigota infrecuente en el protooncogen RET, Cys611Trp, (sólo un caso previo mencionado en la literatura internacional) ⁵ que no fue detectada en un estudio genético previo que presumiblemente no utilizó el método de secuenciación. Además se discute la conducta a seguir en portadores asintomáticos.

Materiales y Métodos

Sujetos: Se estudió una familia de 9 individuos (4 generaciones) con CMFT (Fig. 1). El estudio del caso índice y su descendencia incluyó la historia clínica, examen físico, análisis bioquímicos (calcitonina, PTH, catecolaminas urinarias) y el estudio molecular del protooncogen RET.

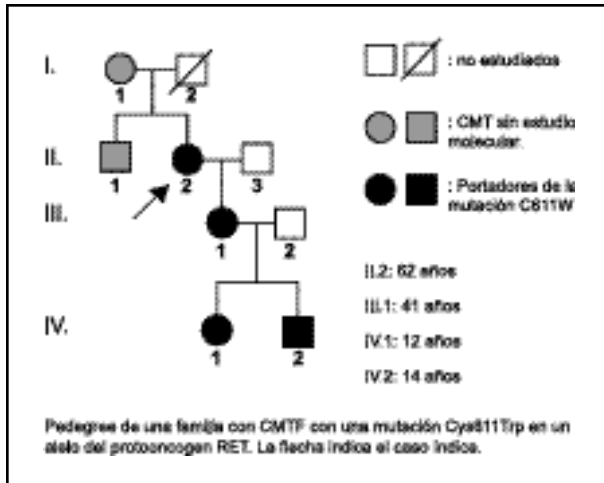


Figura 1.

Análisis bioquímicos: Se dosó calcitoninemia basal (RIA, V.N.: < 15.0 pmol/l) y PTH (RIA, V.N.: < 125.0 pg/ml) en muestras de suero en ayunas de los pacientes portadores de la mutación, sintomáticos (II.2 y III.1) y asintomáticos (IV.1 y IV.2). En muestras de orina de 24 hs de los pacientes portadores sintomáticos se dosó catecolaminas (HPLC, V.N.: Adrenalina: < 8.5 µg/24hs; Noradrenalina: 18.5-100.0 µg/24hs).

Estudio Molecular: En ADN genómico extraído de leucocitos de sangre periférica de la paciente caso índice (II.2) se amplificó por PCR los exones

10, 11, 13, 14, 15 y 16 del protooncogen RET. El ADN genómico fue extraído utilizando GFX Genomic Blood DNA Purification KIT (Amersham Bioscience).

Los "primers" específicos para amplificar los exones mencionados se muestran en la tabla 1.

Aproximadamente 100 ng de ADN fueron amplificados en el equipo Mastercycler Personal (Eppendorf) en un volumen final de 60 µl que contenía: 1.0 mM de cada "primer", 0.25 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl y 3 U Taq polimerasa (Inbio-Highway). Para cada exón se realizó una PCR hot-start.

La PCR se realizó en 10 ciclos de 94°C 2 min, 65°C 1 min y 72°C 2 min, seguidos de 31 ciclos de 94°C 1 min, 60°C 1 min y 72°C 2 min, finalizando con una extensión de 7 min a 72°C.

Mediante una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.0% en buffer TAE, y utilizando bromuro de etidio para su visualización bajo luz U.V., se separaron, y luego se extrajeron los productos amplificados.

Cada uno de los productos extraídos fue secuenciado utilizando dideoxinucleótidos marcados con P33 (Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Bioscience). Luego de separar los productos de la secuenciación en PAGE en condiciones desnaturizantes, se realizó una autorradiografía.

Una vez identificada la mutación Cys611Trp en el caso índice, se realizó el estudio molecular en su descendencia, sujetos III.1, IV.1 y IV.2. De cada uno de ellos se extrajo ADN de leucocitos de sangre periférica y se amplificó y secuenció sólo el exón 10 del protooncogen RET.

Exón	Primer	Tamaño del producto
10	F: 5' GCGCCCCAGGAGGCTGAGTG 3' R: 5' GGTGGTGGTCCCCGCCGCC 3'	187 bp
11	F: 5' GACACGGCAGGCTGGAGAGC 3' R: 5' CTTGAAGGCATCCACGGAGA 3'	352 bp
13	F: 5' GTGCTGCATTTTCAGAGAACG 3' R: 5' GGCTGGGTGCAGAGCCATAT 3'	521 bp
14	F: 5' AGCTGCCTGACCCGCACGCC 3' R: 5' GGCTGGGTGCAGAGCCATAT 3'	287 bp
15	F: 5' GACTCGTGCTATTTTTCTC 3' R: 5' GCTTCCAAGGACTGCCTGC 3'	222 bp
16	F: 5' AGGGATAGGGCCTGGGCTTC 3' R: 5' TAACCTCCACCCAAGAGAG 3'	191 bp

Tabla 1. Secuencia de los "primers" utilizados para amplificar y secuenciar algunos exones del protooncogen RET.

Paciente	Edad presentación del tumor	Cirugía	Calcitoninemia (VN: < 15.0 pmol/L)
I.1	aprox. 80 años	No	sin datos
II.1	aprox. 70 años	Si	sin datos
II.2	60 años	No	70 pmol/L (sin cirugía)
III.1	37 años	Si	700 pmol/L (post cirugía)
IV.1	-----	-----	< 3.0 pmol/L
IV.2	-----	-----	< 3.0 pmol/L

Tabla 2.

Resultados

Análisis bioquímicos: Los pacientes estudiados presentaron valores normales de PTH plasmática y catecolaminas urinarias.

En la tabla 2 se observan los valores de calcitoninemia.

Estudio molecular: En el caso índice (II.2) y su descendencia (III.1, IV.1 y IV.2) se halló un alelo mutado del protooncogen RET: exón 10, Cys611Trp. (Fig. 2)

Discusión

La mutación Cys611Trp ha sido mencionada previamente en un solo caso de la literatura internacional ⁵, y ésta es la primera familia descrita con esta mutación, en este caso asociada a CMTF.

La técnica de secuenciación de ADN genómico utilizada nos permitió detectarla en los cuatro pacientes estudiados genéticamente, dos de ellos con signos clínicos y bioquímicos de enfermedad (CMT). En un estudio genético previo del caso índice, que presumiblemente se basaría en la detección de mutaciones frecuentes o más conocidas no se había logrado detectar la mutación genómica aquí descrita. Una de las técnicas utilizadas para detectar mutaciones es la de PCR con digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP), basada en que la mutación crearía o destruiría un sitio de corte para

la enzima. Considerando las 40 mutaciones teóricamente posibles en los codones 609, 611, 618, 620 y 634, 32 de ellas pueden ser detectadas por PCR-RFLP, para lo que se necesitaría contar con unas 15 enzimas, quedando otros codones sin explorar. Las 8 mutaciones restantes no crean ni destruyen un sitio de restricción, por lo que no serían detectadas por esta técnica ². El gran número de enzimas necesarias para realizar la pesquisa de mutaciones en los codones más frecuentemente mutados, sumado a la baja frecuencia con que se dan las mutaciones en el codón 611 (2-3%), nos hace suponer que no permitieron realizar la detección previa de la mutación Cys611Trp. La secuenciación directa de ADN genómico, si bien es una técnica más laboriosa y costosa que PCR-RFLP, permite detectar cualquier mutación en cualquier codón del gen estudiado.

Por las características clínicas y bioquímicas, se trataría de una familia portadora de CMTF, síndrome que según una definición del Consorcio Internacional de mutaciones del gen RET requiere un mínimo de 4 miembros afectados por CMT, sin evidencias objetivas de feocromocitoma ni hiperparatiroidismo ⁶.

El CMTF sería la variante más moderada de NEM 2. Entre los pacientes rotulados con este diagnóstico es posible que haya sujetos con NEM 2A y baja penetración para feocromocitoma e hiperparatiroidismo. Por este motivo, en el 7mo. Congreso Internacional de NEM, se sugirió ampliar la exigencia de número de familiares afectados a diez, contando varios de ellos con más de 50 años de edad ¹. Si bien la evolución clínica sería más benigna en esta variante de NEM 2, y la conducta quirúrgica temprana o preventiva planteada para el resto de las variantes de NEM 2, no estaría clara para algunos autores ⁷, en el Congreso Internacional mencionado ¹ y durante el Consorcio Europeo de NEM (EUROMEN) ⁸, no se ha diferenciado la actitud terapéutica ante estos pacientes de aquellos portadores de NEM 2A.

En cambio, sí se sugieren conductas terapéuticas diferentes basándose en el codón afectado. Los codones serían así clasificados en tres categorías que predecirían la variante sindrómica, la edad de aparición del CMT y su agresividad. Según esta clasificación, los pacientes afectados por mutaciones en el codón 611 (junto a 634, 620 y 610)

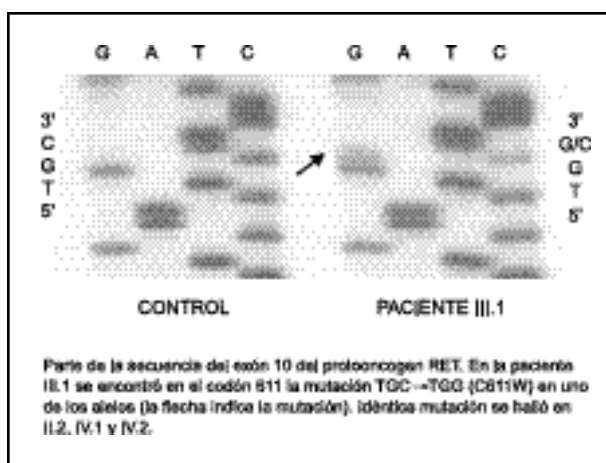


Figura 2.

pertenerían a la categoría II de tres niveles, sugiriendo riesgo intermedio y recomendándose tiroidectomía total, incluyendo la cápsula posterior, antes de los 5 años de edad en portadores asintomáticos ^{1,9}.

Por otro lado, es interesante destacar que en el EUROMEN, cuyas conclusiones fueron publicadas en el año 2003, si bien la mayoría de los pacientes incluidos en este estudio portaban mutaciones en el codón 634 (categoría II del 7mo. Congreso Internacional), ninguno de los pacientes con mutaciones en el codón 611 tuvo evidencia de CMT antes de los 5 años de edad, y las metástasis ganglionares raramente se presentaron antes de los 14 años.

La familia estudiada en el presente trabajo

parece encuadrar en la definición de CMTF. La observación de la tabla 2 sugiere, a lo largo de las generaciones presentadas, una tendencia a mayor agresividad en el curso de la enfermedad y edad de presentación más temprana. El fenómeno de anticipación genética ha sido previamente relatado en NEM 1 ¹⁰.

Si bien los miembros de la cuarta generación son clínicamente asintomáticos y las calcitoninemias basales normales (los padres no han dado aún autorización para el estudio del estímulo de la secreción de calcitonina posterior a la infusión de calcio), nuestra postura médica sería la de efectuar tiroidectomía profiláctica basándonos en los estudios de consenso internacional mencionados.

Bibliografía

1. Brandi, M.L.; Gagel, R.; Angeli, A. y col. Consensus: Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86 (12): 5658-5671.
2. Gagel, R.F.; Cote, G.J.; Bugalho, M.J. y col. Clinical use of molecular information in the management of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Journal of Internal Medicine* 1995; 238: 333-341.
3. Eng, C.; Clayton, D.; Schuffenecker, I. y col. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: International RET Mutation Consortium Analysis. *JAMA.* 1996; 276: 1575-1579.
4. Cote, G.; Wohlk, N.; Evans y col. RET proto-oncogen mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab.* 1995; 9: 609-629.
5. Donis-Keller, H.; Dou, S.; Chi, D. y col. Mutations in the RET proto-oncogen are associated with MEN 2A and FMTC. *Human Molecular Genetics.* 1993; 2: 851-856.
6. Mulligan, L.; Marsh, D.; Robinson, B. y col. Genotype-phenotype correlation in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: report of the International RET Mutation Consortium. *J Intern Med* 1995; 238: 343-346.
7. Hansen, H.; Topping, H.; Godballe, C. y col. Is Thyroidectomy Necessary in RET Mutations Carriers of the Familial Medullary Thyroid Carcinoma Syndrome? *Cancer.* 2000; 89(4): 863-867
8. Machens, A.; Niccoli-Sire, P.; Hoegel, J. y col. (the European Multiple Endocrine Neoplasia, EUROMEN, Study Group). Early Malignant Progression of hereditary Medullary Thyroid Cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 1517-1525.
9. Yip, L.; Cote, G.; Shapiro, S. y col. Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: Evaluation of the Genotype-Phenotype relationship. *Arch Surg.* 2003; 138: 409-416.
10. Giraud, S.; Choplin, H.; Teh, B. y col. A Large Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Family with Clinical Expression Suggestive of Anticipation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 3487-3492.

TRABAJO ORIGINAL 2^{DO} PREMIO A COMUNICACIONES LIBRES ENTREGADO EN EL XIII CONGRESO DE LA SAEM

Efecto del INGAP (Proteína Asociada a la Neogénesis Insular) sobre la secreción de insulina de islotes pancreáticos de ratas adultas y recién nacidas.

Effect of INGAP (Islet Neogenesis Associated Protein) upon insulin secretion of pancreatic islets from adults and neonatal rats.

Borelli, M.I.¹; Stoppiglia, L.F.²; Rezende, L.F.²; Flores, L.E.¹; Del Zotto, H.¹; Boschero, A.C.²; Gagliardino, J.J. ¹

¹ CENEXA, Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP - CONICET, Centro Colaborador OPS/OMS), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, ² Departamento de Fisiología y Biofísica, Instituto de Biología, Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

Resumen

El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto del péptido sintético 15aa- del INGAP (Proteína Asociada a la Neogénesis Insular), derivado de la secuencia de aminoácidos de la molécula del INGAP, sobre la secreción de insulina. Para ello aislamos islotes de ratas Wistar macho adultas y de neonatos y los cultivamos en presencia de glucosa 10 mM con o sin el agregado de 15aa-INGAP 30 µM. Posteriormente incubamos estos islotes con glucosa (2.8, 8.3 y 16.7 mM), leucina y arginina (10 mM). La insulina se determinó en el medio de incubación por radioinmunoanálisis. El pentadecapéptido de INGAP aumentó significativamente la secreción de insulina en respuesta a los diferentes estímulos estudiados tanto en los islotes de ratas adultas como de recién nacidas. Los valores de insulina fueron significativamente más altos en los islotes de ratas adultas. Nuestros resultados demuestran por primera vez que el pentadecapéptido del INGAP incrementa la respuesta secretora de las células pancreáticas. Por lo tanto, su empleo representaría una alternativa terapéutica potencial para la prevención y el tratamiento de la diabetes.

Abstract

Aim: This study was undertaken to determine the effect of 15aa-INGAP upon insulin secretion.

Material and methods: Isolated islets (collagenase) from normal male adult or neonatal Wistar rats were cultured (4 days) in RPMI 1640 medium, in the presence of 10mM glucose with or without the addition of 15aa-INGAP to the medium (30µM). After culture, the islets were incubated during 90 min in the presence of 2.8, 8.3 or 16.7 mM glucose, or 8.3 mM glucose plus 10mM leucine or arginine. Insulin was measured in the incubation medium by radioimmunoassay.

Dirección Postal: Dr. Juan José Gagliardino. CENEXA (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas, Calles 60 y 120 - 1900 La Plata. Teléfono: (0021) 423 67 12. Fax: (0021) 422 20 81. E-mail: cenexa@speedy.com.ar

Palabras clave: INGAP, secreción de insulina, páncreas endocrino

Key words: INGAP, Insulin Secretion, Endocrine Pancreas

Results: Insulin secretion of islets from either neonatal or adult rats was significantly enhanced in the presence of 15aa-INGAP in the culture media in response to glucose or other secretagogues (leucine and arginine). Islets from adult rats released significantly larger amounts of insulin than those from newborn rats.

Conclusions: Our results demonstrate for the first time that INGAP enhanced the β -cell response to glucose and aminoacids. Therefore, INGAP would represent a treatment alternative for patients with diminished insulin secretion.

Introducción

Numerosos genes, hormonas y factores de crecimiento local están involucrados en el desarrollo y crecimiento de los islotes pancreáticos¹. Uno de estos factores es el INGAP (proteína asociada a la neogénesis insular, Islet NeoGenesis Associated Protein), que fuera descubierto en 1983 por Rosenberg y col. cuando hallaron que la envoltura en celofán de la cabeza del páncreas de hamsters normales inducía neogénesis insular². Del extracto parcialmente purificado obtenido de la cabeza de estos páncreas aislaron un complejo proteico denominado "ilotropina", capaz de inducir la neoformación de islotes pancreáticos³. Posteriormente se demostró que la ilotropina podía revertir en un 50% la diabetes inducida en hamsters mediante la inyección de estreptozotocina⁴.

Este grupo de investigadores también identificó el gen del INGAP, cuyo producto de expresión es una proteína de 171 aminoácidos (20 kDa) que sería la responsable del efecto neogénico insular⁵. Asimismo demostraron que un péptido de 15 aminoácidos derivado del INGAP (15aa-INGAP) ejerce la misma acción biológica que la proteína completa, estimulando la incorporación de timidina tritiada en células ductales del páncreas⁵.

Rafaeloff y col. plantearon inicialmente que el INGAP se sintetizaba sólo en el páncreas exocrino⁵; sin embargo nuestro grupo demostró que: a) el aumento significativo de células INGAP positivas en el páncreas de animales con hiperplasia y neogénesis insular consecutiva a la insulinoresistencia inducida por dieta rica en sacarosa ocurre primordialmente a nivel insular⁶, y b) la presencia de la proteína INGAP y su ARNm en islotes pancreáticos de hamsters normales⁷. Además de demostrar la presencia del INGAP en hamsters, también se lo halló, mediante técnicas inmunocitoquímicas, en

páncreas de fetos de ratones⁸, en ratas normales adultas (Del Zotto y col., datos no publicados) y en tumores pancreáticos humanos^{9,10}.

Hasta el momento se desconoce el posible efecto del INGAP sobre la secreción de insulina. Para responder dicho interrogante, en el presente trabajo estudiamos la secreción de insulina en respuesta a glucosa y aminoácidos en islotes de rata normales previamente cultivados con glucosa, con o sin el agregado de INGAP.

Material y Métodos

Drogas y reactivos

Colagenasa tipo V, albúmina sérica bovina (ASB) y otros reactivos del más alto grado de pureza se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), mientras que ¹²⁵I proviene de Amersham (Buckinghamshire, UK).

Animales de experimentación y aislamiento de islotes

Los experimentos se hicieron con ratas Wistar recién nacidas (RN) (1 ó 2 días de edad) y adultas (A) (4 a 6 meses de edad). Para el aislamiento de islotes, las ratas se sacrificaron por decapitación, se les extrajo el páncreas y posteriormente esos páncreas fueron digeridos con colagenasa¹¹. Los islotes se lavaron para remover el resto de colagenasa y se cultivaron bajo diversas condiciones.

Cultivo de islotes

Los islotes de RN y A se cultivaron a 37° C durante 4 días en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con NaHCO₃ 2 g/l, 1% penicilina/estreptomycin, pH 7.4, 5% de suero fetal bovino y glucosa (G) 10 mM, con o sin el agregado de 30 μ M de INGAP. El medio se cambió cada 48 horas.

Secreción de insulina "in vitro"

Luego del cultivo, los islotes se preincubaron durante 60 minutos a 37° C en 1.0 ml de buffer Krebs-Ringer bicarbonato (KRB), pH 7.4, previamente gaseado con una mezcla de CO₂/O₂ (5%/95%), conteniendo 1.5 % (p/v) ASB y 5.6 mM de G. Después de este período, grupos de 5 islotes de RN o A se incubaron durante 90 minutos en las mismas condiciones, más el agregado de diferentes concentraciones de G (2.8, 8.3 y 16.7 mM); en otra serie de experimentos, islotes de ambos grupos se incubaron en presencia de 8.3 mM de G con el agregado de L-leucina (Leu) o L-arginina (Arg) (10 μM)¹². Al final del período de incubación, se tomaron alícuotas del medio para medir posteriormente insulina por radioinmunoanálisis¹³.

Análisis estadístico

La media ± EEM de los valores de secreción de insulina se compararon utilizando el test de Turkey-Kramer (ANOVA). El valor de p aceptado como estadísticamente significativo fue < 0.05.

Resultados

La secreción de insulina en islotes de RN (Tabla I) y A (Tabla II) aumentó en función de la concentración de G en el medio de incubación. La cantidad absoluta de insulina liberada fue significativamente mayor en los islotes de A, al igual que el porcentaje de incremento en función de la concentración de G (G mM 2.8 vs. 8.3 y 8.3 vs. 16.7, A= 307% y 165% vs. RN= 98% y 93%). Los islotes de A también liberaron

más insulina en respuesta al estímulo glucosa-aminoácidos. El agregado de 15aa-INGAP 30 μM aumentó significativamente la liberación de insulina en A y RN en todas las condiciones experimentales estudiadas (Tablas I y II); el incremento de la respuesta secretora inducido por el pentadecapéptido fue mayor en A, exceptuando la concentración de G 16.7 mM (A vs. RN, G mM = 2.8, 390 vs. 245; 8.3, 662 vs. 128; 16.7, 175 vs. 231; 8.3 + Arg, 246 vs. 173; 8.3 + Leu, 249 vs. 192).

Discusión

En estudios previos demostramos que el incremento del contenido de INGAP registrado en los islotes de hamsters normales alimentados con dieta rica en sacarosa, coincidía con un aumento de la liberación de insulina en respuesta a la glucosa⁶. Los resultados actuales demuestran por primera vez que islotes aislados de RN o A normales y cultivados con el péptido de 15aa-INGAP liberan más insulina que los islotes control en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa y aminoácidos (Arg y Leu).

La molécula de INGAP presenta homología con la familia de los genes Reg descritos por Abe y col.¹⁴, cuyos productos de expresión también afectan la regeneración de islotes. Para verificar si el efecto del INGAP sobre la neogénesis insular se relacionaba con el de esas proteínas, Rafaeloff y col. seleccionaron en la molécula de INGAP una secuencia de 15 aminoácidos que no se encuentra en la proteína Reg y sintetizaron el 15aa-INGAP. Este pen-

Tabla 1. Secreción de insulina de islotes de ratas recién nacidas.

	Control	15aa- INGAP (30 μM)
G 2.8 mM	0.82 ± 0.06	2.83 ± 0.74*
G 8.3 mM	1.62 ± 0.06	3.70 ± 0.29*
G 16.7 mM	3.12 ± 0.13	10.32 ± 0.86*
G 8.3 mM + Arg 10 mM	3.98 ± 0.32	10.87 ± 0.23*
G 8.3 mM + Leu 10 mM	3.43 ± 0.38	10.02 ± 0.56*

Los valores de secreción de insulina (ng/islote/h) se expresan como la X ± EEM. En todos los casos, n = 6 y *p < 0.05 control vs 15aa INGAP. G: glucosa; Arg: arginina; Leu: leucina.

Tabla 2. Secreción de insulina de islotes de ratas adultas.

	Control	15aa- INGAP (30 μM)
G 2.8 mM	1.07 ± 0.11	5.24 ± 0.17*
G 8.3 mM	4.36 ± 0.25	33.32 ± 2.82*
G 16.7 mM	11.55 ± 0.99	31.81 ± 1.27*
G 8.3 mM + Arg 10 mM	10.39 ± 0.52	36.00 ± 2.90*
G 8.3 mM + Leu 10 mM	9.82 ± 0.43	34.25 ± 1.30*

Los valores de secreción de insulina (ng/islote/h) se expresan como la X ± EEM. En todos los casos, n = 6 y *p < 0.05 control vs 15 aa INGAP. G: glucosa; Arg: arginina; Leu: leucina.

tadecapéptido estimuló la incorporación de timidina tritiada en células del epitelio pancreático ductal y de una línea de células epiteliales del páncreas (ARIP), pero no afectó dicha incorporación en islotes normales o en líneas de células tumorales ⁵. En función de esos resultados los autores concluyeron que el efecto neogénico del INGAP era independiente de su posible homología con las proteínas Reg. Como sustento a esta interpretación, recientemente los mismos autores demostraron que la regulación de la expresión de ambas proteínas sería diferente, ya que existen importantes diferencias en los sitios promotores de sus respectivos genes ¹⁵.

Aunque todavía no se ha aislado un receptor de INGAP, es probable que en nuestras condiciones experimentales, al igual que en el caso de la incorporación de timidina en los experimentos de Rafaeloff y col. ⁵, el INGAP afecte la secreción de insulina a través de la interacción de su pentadecapéptido con algún receptor insular. La demostración previa de que el INGAP estimula la neogénesis insular por un mecanismo de tipo paracrino ¹⁶ apoya esta hipótesis. La verificación de dicha posibilidad es parte de las investigaciones en curso en nuestro laboratorio.

En nuestras condiciones experimentales, los islotes de ratas adultas cultivados con o sin el pentadecapéptido de INGAP liberaron más insulina que los islotes de las ratas recién nacidas en respuesta a la glucosa y a los aminoácidos. Esto se explicaría por la maduración del sistema secretor de las células luego del nacimiento ¹⁷.

Aunque todavía no se conoce el mecanismo de acción del INGAP y de su pentadecapéptido –receptor específico y cascada de mediadores intracelulares– estos resultados y otros previos referidos a su efecto neogénico ^{5,6} tienen un gran potencial médico. En efecto, el INGAP y/o su pentadecapéptido podrían ser útiles para recuperar la masa y función de las células en personas con diabetes. Esta alternativa adquiere mayor importancia si se considera la prevalencia actual de la diabetes, su crecimiento estimado y su elevado costo socioeconómico ¹⁸. En este sentido, y considerando que la forma de presentación más frecuente de la diabetes es la del adulto, es importante consignar como hecho favorable que la respuesta al pentadecapéptido fue mayor en islotes de animales adultos que en los de recién nacidos.

En resumen, nuestros resultados demuestran que el pentadecapéptido del INGAP aumentó la capacidad liberadora de insulina de islotes de ratas normales recién nacidas y adultas. Este efecto, sumado al ejercido sobre la neogénesis insular, convierten al INGAP en una alternativa terapéutica potencial para la prevención y el tratamiento de la diabetes.

Agradecimientos

El trabajo se realizó con fondos de CONICET y de las Fundaciones brasileñas FAPESP y CNPQ/PRONEX. Los autores agradecen a LA Di Maggio y A. Díaz por su colaboración en la edición del manuscrito y la realización del radioinmunoanálisis respectivamente. Asimismo agradecen a ME Amaral y EP Araujo por la asistencia técnica brindada.

Bibliografía

1. Edlund, H. Developmental biology of the pancreas. *Diabetes* 2001; 50: (Suppl 1) S5–S9.
2. Rosenberg, L.; Brown, R.A.; Duguid, W.P. A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas. *J Surg Res* 1983; 35:63-72.
3. Pittenger, G.L.; Vinik, A.I.; Rosenberg, L. The partial isolation and characterization of ilotropin, a novel islet-specific growth factor. *Adv Exp Med Biol* 1992; 321:123–130.
4. Gold, G.; Broderick, C.; Carfagna, M. y col. INGAP treatment improves glycemic control in SZ diabetic hamsters. *Diabetes* 1998; 47:(Suppl. 1): A253.
5. Rafaeloff, R.; Pittenger, G.L.; Barlow, S.W. y col. Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters. *J Clin Invest* 1997; 99:2100–2109.

6. Gagliardino, J.J.; Del Zotto, H.; Massa, L. y col. The pancreatic duodenal homeobox-1 (Pdx-1)/Islet neogenesis-associated protein (INGAP): A possible combined marker of activable islet-cell precursors. *J Endocrinol* 2003; 177:249-259.
7. Flores, L.E.; García, M.E.; Borelli, M.I. y col. Expression of islet neogenesis-associated protein in islets of normal hamsters. *J Endocrinol* 2003; 177:243-248.
8. Rafaeloff-Phail, R.; Shmitt, E.; Edlund, H. y col. Expression of INGAP during ontogeny of the pancreas. *Diabetes* 1998; 47(Suppl.1):A259.
9. Rafaeloff-Phail, R.; Schmitt, E.; Sandusky, G. y col. Is a human cytokine expressed only in the presence of islet neogenesis? *Diabetes* 1998; 47(Suppl. 1): A259.
10. Semakula, C.; Pambuccian, S.; Gruessner, R. y col. Clinical case seminar: hypoglycemia after pancreas transplantation: association with allograft nesidiodyplasia and expression of islet neogenesis-associated peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3548-3554.
11. Lacy, P.E.; Kostianovsky, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16:35-39.
12. Sodoyez-Goffaux, F.; Sodoyez, J.C.; De Vos, C.J. y col. Insulin and glucagon secretion by islets isolated from fetal and neonatal rats. *Diabetologia* 1979; 16:121-123.
13. Herbert, V.; Lau, K.S.; Gottlieb, C.W. y col. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1965; 25:1375-1384.
14. Abe, M.; Nata, K.; Akiyama, T. y col. Identification of a novel Reg family gene, Reg III delta, and mapping of all three types of Reg family gene in a 75 kilobase mouse genomic region. *Gene* 2000; 246:111.
15. Taylor-Fishwick, D.A.; Rittman, S.; Kendall, H. y col. Cloning genomic INGAP: a Reg-related family member with distinct transcriptional regulation sites. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1638:8389.
16. Rosenberg, L.; Vinik, A.I.; Pittenger, G.L. y col. Islet-cell regeneration in the diabetic hamster pancreas with restoration of normoglycaemia can be induced by a local growth factor(s). *Diabetologia* 1996; 39:256-62.
17. Asplund, K. The effect of glucose on the insulin secretion in foetal and newborn rats. In: *The structure and metabolism of the pancreatic islets. Proceedings of an International symposium, Umea, Sweden.* Ed Pergamon Press 1969; 16:477-485.
18. Mc Carty, D.; Zimmet, P. *Diabetes 1994 to 2010: Global estimates and projections.* Merilbourne International Diabetes Institute, 1994.

“Es una locura amar a menos que se ame con locura”.

TRABAJO ORIGINAL

Tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica con pamidronato intravenoso.

Postmenopausal osteoporosis treatment with intravenous pamidronate.

Spivacow, F.R.; Sarli, M.; Zanchetta, J.R.

Instituto de Investigaciones Metabólicas (IDIM), Universidad del Salvador (USAL) Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Los bifosfonatos constituyen el tratamiento de elección de la osteoporosis. Promueven un incremento en la densidad mineral ósea (DMO) y una reducción del número de fracturas. Sin embargo, no todos los pacientes pueden tolerar los mismos incluso los ingeridos semanalmente, como el risidronato que tendría mejor tolerancia digestiva. El presente trabajo describe el seguimiento, a tres años, de un número inicial de 34 pacientes con osteoporosis posmenopáusica tratados con pamidronato IV. Los resultados obtenidos muestran un incremento de la DMO del 3.5% (n=34), 6.3% (n=19) y 8% (n=7) ($p < 0.05$, < 0.02 , < 0.01) en columna lumbar del primero al tercer año respectivamente. La DMO del cuello femoral aumentó un 3.8% el primer año ($p < 0.05$) y disminuyendo los años subsiguientes, pero manteniéndose sobre los niveles basales. Los marcadores bioquímicos mostraron un incremento significativo de los niveles de hormona paratiroidea (PTHrP) a los 6 meses manteniéndose estable durante el resto del tratamiento. Los marcadores de remodelado óseo mostraron una significativa caída de los valores de deoxipiridinolina urinaria que se mantuvo durante todo el periodo de seguimiento y una caída de los valores de fosfatasa alcalina total hasta los 12 meses que se perdió con posterioridad. Al cabo de tres años, los controles radiológicos anuales, sólo mostraron una fractura vertebral. Se produjeron efectos adversos menores en el 17% de los pacientes, aunque en ninguno de los casos hubo necesidad de suspender el tratamiento. En conclusión: el tratamiento con pamidronato IV, utilizado hasta tres años, puede ser una alternativa válida para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica.

Abstract

Bisphosphonates are currently the treatment of choice for osteoporosis. These agents promote an increase in bone mineral density (BMD) and a reduction in the risk of fractures. However, bisphosphonates, including risidronate, may be not well tolerated, even when administered on a weekly basis. **Objective:** to assess the use of IV Pamidronate (APD) in 34 patients with postmenopausal osteoporosis followed up for three years.

Dir ección Postal: Instituto de Investigaciones Metabólicas. Universidad del Salvador (USAL) Libertad 836, 1° Piso (1012) Buenos Aires, Argentina. Teléfono: 5031-9700. E-mail: spiva@idim.com.ar

Palabras clave: Tratamiento de Osteoporosis. Bifosfonatos. Pamidronato IV.

Key words: Osteoporosis. Treatment. Bisphosphonates. Intravenous Pamidronate.

Recibido: 02-09-03

Results: BMD at the lumbar spine increased 3.5% (n=34), 6.3% (n=19) and 8% (n=7) ($p<0.05$, 0.02, 0.01) from baseline examination to the three-year follow up, respectively. BMD at the femoral neck increased 3.8% ($p>0.05$) during the first year and slightly declined in the second and third year, within baseline values. Biochemical parameters showed that (i) PTH increased significantly at 6 months and remained steady over the follow-up period. The markers for bone turnover showed a continuous significant decrease in deoxypyridoline during treatment and a marked reduction of total alkaline phosphatase for the first 12 months, which disappeared thereafter. Radiological examinations, carried out on a yearly basis, only revealed an additional vertebral fracture. Minor adverse events, which did not require dropping out the treatment, were observed in 17% of the cases.

Conclusion: The administration of IV Pamidronate for 3 years proved to be useful for the treatment of postmenopausal osteoporosis.

Introducción

Los bifosfonatos son, en nuestro días, las drogas de elección para el tratamiento de la osteoporosis debido a su capacidad de inducir incrementos en la DMO y disminución en el riesgo de fracturas ¹. Desafortunadamente, su baja absorción intestinal requiere prolongados períodos de ayuno luego de su toma por vía oral, y por otro lado, estos agentes producen una alta incidencia de efectos adversos gastrointestinales ²⁻³.

La buena tolerancia de algunos bifosfonatos por vía parenteral, permite su uso para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica ⁴⁻⁷.

Nosotros publicamos recientemente nuestra experiencia con el pamidronato intravenoso en dosis entre 120 y 180 mg/año ⁸. Este estudio reveló un significativo incremento de la DMO en columna lumbar y un mantenimiento en sus valores en cuello femoral, acompañados de una disminución de los marcadores de recambio óseo y prevención de la ocurrencia de nuevas fracturas durante el año de tratamiento. Estos resultados son similares a los reportados por otros autores ^{4,5-7}.

El objetivo de este trabajo es evaluar la utilidad del pamidronato intravenoso en el tratamiento de una población de 34 mujeres con osteoporosis posmenopáusica, tratadas durante un período de tres años.

Material y Métodos

Se incluyeron 34 pacientes con Osteoporosis Posmenopáusica de acuerdo con los criterios de la WHO ⁹ (T score en Columna Lumbar y/o Cuello de Fémur inferior a -2.5).

La mayoría de las mujeres recibieron APD IV cuando presentaban intolerancia digestiva que hacía riesgosa la administración oral de bifosfonatos de cualquier tipo.

Fueron excluidas todas aquellas mujeres que presentaran patología del metabolismo fosfocálcico o hubieran recibido medicación osteoactiva durante más de un mes, en los últimos 6 meses.

El APD se administró diluido en 500 ml de solución de Dextrosa al 5% en una vena anterocubital voluminosa, durante un lapso entre 3 y 4 horas. La dosis de APD anual administrada fue de 120 mg. Veinte pacientes recibieron un goteo trimestral de 20 mg y las 14 restantes dos goteos semestrales de 60 mg.

Todos los pacientes recibieron 1000 mg de calcio elemento como suplementos farmacológicos independientemente del aporte dietético; los niveles de 25 OH vitamina D se mantuvieron en niveles superiores a 20 ng/ml y se administraron suplementos orales si sus concentraciones eran inferiores a este valor.

Las características basales de nuestros pacientes se muestran en la Tabla I.

La densidad mineral ósea en Columna Lumbar y Cuello de Fémur fue medida por DEXA Lunar DPX IQ (Lunar Corp. De Madison; WI) y Hologoc Delphy (Hologic Inc. De Whatman MA). Cada paciente fue medido siempre en el mismo aparato. Los valores DMO en columna lumbar y en Cuello de fémur fueron adaptados según parámetros de estandarización previamente descritos ¹⁰, con fines analíticos. Los equipos fueron calibrados diariamente de acuerdo con las pautas de los fabricantes. Los coeficientes de variación de las mediciones en Columna Lumbar y Cuello de fémur utilizando los diferentes equipos oscilan entre 1 y 1.7% para Columna Lumbar y de 2 a 2.5% en Cuello de fémur.

Tabla I: Características Basales (n=34)

Edad-Años	66 ± 5.8
Altura-m	1.55 ± 0.05
Peso-kg	63 ± 9
Edad de Menopausia	47 ± 5
BMD L2-L4 g/cm ²	0.744 ± 0.86
T-score L2-L4	-3.22 ± 0.13
BMD Cuello de fémur g/cm ²	0.639 ± 0.74
T-score Cuello de fémur	-2.74 ± 0.15
Número de fracturas	21
Deoxyppyr / Creat.	6.17 ± 2.3
Osteocalcina	7.46 ± 2.3

Resultados en $\bar{X} \pm DS$

Se realizaron a todos los pacientes estudios radiológicos en Columna dorsal y lumbar al inicio del tratamiento y luego anualmente, con la finalidad de detectar nuevas fracturas vertebrales, definiendo a las mismas con una reducción de la altura vertebral anterior, media o posterior superior al 25%.

Se realizaron mediciones de laboratorio en condiciones basales, a los 3, 6 y 12 meses y luego una vez por año. Se midieron los niveles plasmáticos de calcio total (Espectrofotometría de absorción atómica VN: 8.8-10.5 mg%), Calcio iónico (Electrodo específico VN: 4.5-5.2 mg%), fosfatasa alcalina total y su isoenzima ósea (Método cinético VN: 90-280 UI/L y 20-48%), PTH (i) (Allegro PTH Nichols Institute, San Juan Capistrano, VN: 10-65 pg/ml), osteocalcina (RIA VN: 3-11 ng/ml), creatinina, hepatograma, hemograma con recuento de plaquetas y proteino-grama. En orina de ayuno, luego de la ingestión de 300 ml de agua bidestilada se midió la excreción de calcio, deoxipiridinolina (Elisa, Metra Biosystems VN mujeres: 3-8 nM DPir/mM Creat).

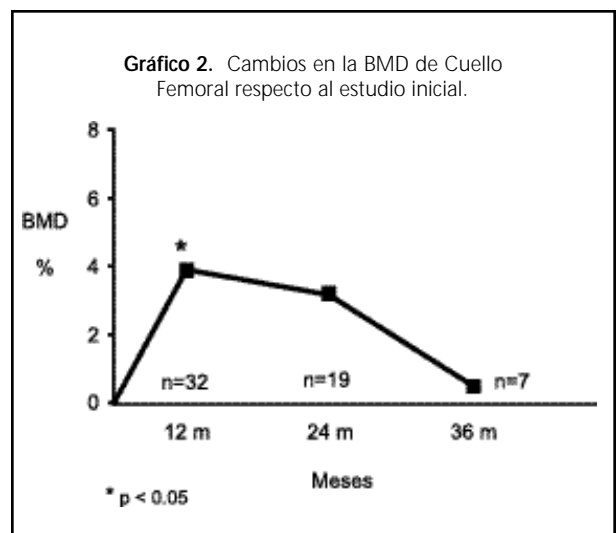
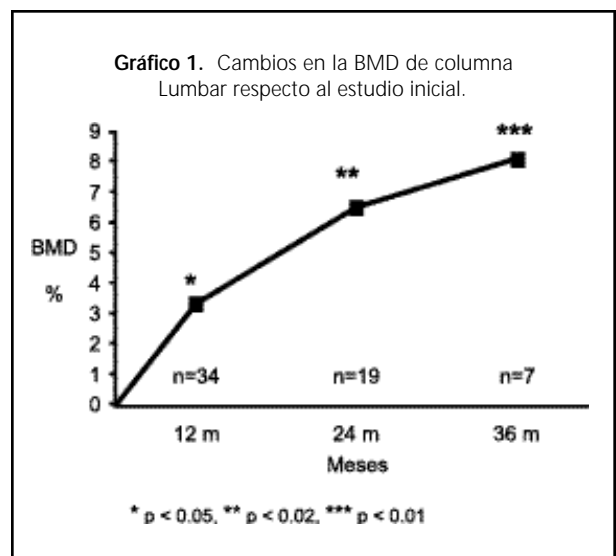
Se llevó un registro detallado de los efectos adversos de la medicación especialmente durante la infusión y la semana posterior. Se evaluó la presencia de hipertermia, cuadro pseudogripal, flebitis, síntomas de hipocalcemia, mioartralgias, hipotensión y estado nauseoso. La toxicidad hematológica, hepática y renal fue evaluada trimestralmente.

Se analizaron los resultados obtenidos en la población total de pacientes estudiados. La significación de las diferencias entre las mediciones den-

sitométricas basales y en los años siguientes se efectuó mediante el test de Student para muestras apareadas al igual que aquellas entre los parámetros bioquímicos. Se consideró significativa una $p < 0.05$.

Resultados

Los cambios densitométricos observados en los diferentes periodos de control se observan en el Gráfico I y II.



Se comprobó un aumento progresivo en la densidad mineral ósea de Columna Lumbar durante todo el período de seguimiento, (3.5%, 6.3%, y 8% respectivamente). En el Cuello de fémur sólo se observó un aumento del 3.8% en el primer año, en donde alcanzó significado estadístico, que perdió posteriormente aunque siempre se mantuvo por encima de los valores basales hasta el tercer año.

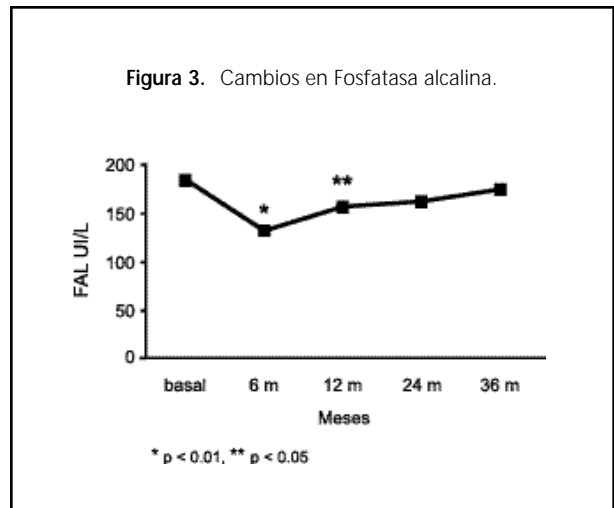
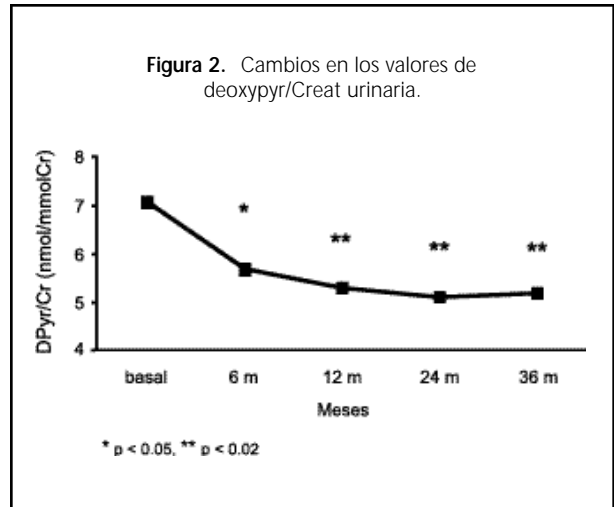
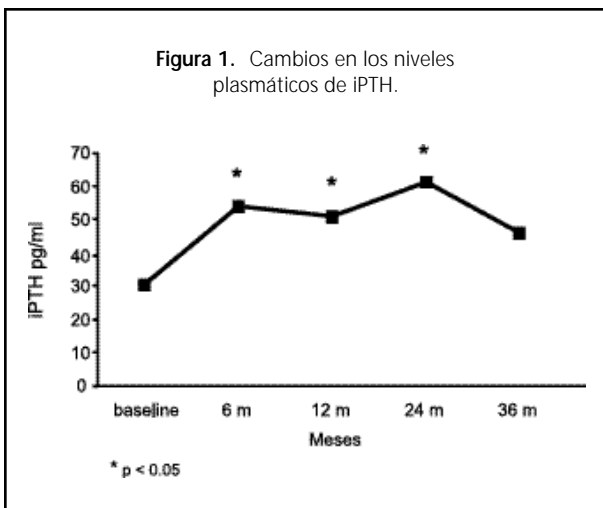
Siete pacientes del total (20%) no presentaron cambios significativos en las densitometrías óseas de Columna Lumbar y/o Cuello de fémur y en sólo 2 (7%) pudo demostrarse una pequeña reducción de la densidad ósea en Cuello de fémur.

No encontramos cambios de interés en los valores de calcio sérico y calcio iónico a lo largo del seguimiento. En cambio la PTH (i) aumentó significativamente a los 6 meses y se mantuvo durante todo el seguimiento, como se observa en la (Figura I).

La excreción de deoxipiridinolina disminuyó significativamente a los 6 meses, alcanzado el nadir a los 24 meses y manteniéndose reducida durante todo el seguimiento (Figura II).

La fosfatasa alcalina total disminuyó significativamente a los 6 meses, manteniendo su significado hasta los 12 meses, aumentando posteriormente hasta alcanzar valores casi normales posteriormente (Figura III).

No encontramos variaciones en los valores de osteocalcina ni fosfatasa alcalina ósea en todo el estudio. Tampoco se encontraron variaciones signi-



ficativas en el hemograma, hepatograma, recuento de plaquetas y creatinina sérica. Es de destacar que casi todos los datos de laboratorio presentados fueron obtenidos previamente a la administración del APD.

Seis pacientes de 34 presentaron efectos adversos (Tabla II) leves que no obligaron a suspender el tratamiento en ninguno. Es de destacar que algunos pacientes presentaron más de un efecto adverso.

Al cabo de los 36 meses de seguimiento sólo registramos una nueva fractura vertebral, mientras que otro paciente presentó una fractura en tobillo que no la consideramos de tipo osteoporótico.

Tabla II: Eventos adversos
8 eventos en 6 pacientes (17%)

Cuadro pseudogripal:	3
Hipertermia:	3
Mioartralgias	1
Hipotensión:	1

Discusión

Además de las indicaciones "clásicas" del uso de pamidronato parenteral aceptadas universalmente ¹¹, han surgido nuevas indicaciones que tienen que ver con la pérdida de masa ósea secundaria a drogas ^{12,13}. Sin embargo son pocos los trabajos vinculados a la prevención ¹⁴ y tratamiento de la Osteoporosis posmenopáusica ^{8,15-16}.

En el primer estudio publicado, en 1990 ¹⁵, se lo utilizó sólo o en combinación con Flúor. Logrando aumentos significativos de la densidad mineral ósea en columna lumbar luego de un año de tratamiento.

Dos estudios prospectivos y abiertos posteriores, probaron la eficacia del APDIV en la osteoporosis posmenopáusica ¹⁶⁻¹⁷. En el primero de ellos ¹⁶ se constató una mejoría de la densidad mineral en columna lumbar, cuello femoral y radio en 16 pacientes tratadas con 120 mg/año de APD seguidas durante dos años. Los resultados fueron superiores a los obtenidos en un segundo grupo tratado con fluoruro de sodio. En este último grupo la densidad mineral no se modificó en cuello de fémur y, contrariamente, disminuyó 4.3% en radio. Es de destacar que los efectos adversos y la incidencia de nuevas fracturas fue significativamente menor entre los pacientes tratados con APDIV.

En el segundo estudio ¹⁷ los goteos de APD se ajustaron según calciuria de ayuno, éstas eran medidas cada dos semanas, y un nuevo goteo se administró cuando las mismas regresaban a valores basales. Con este esquema los autores comprobaron un bloqueo de la reabsorción ósea, medido por los parámetros bioquímicos, y un aumento del 7% en la densidad mineral en columna lumbar al año.

En 1998 nosotros publicamos nuestra primera experiencia en 10 mujeres con osteoporosis posmenopáusica y patología gastrointestinal, tratadas

con pamidronato intravenoso durante un año ¹⁰. En este estudio observamos un aumento del $6.27 \pm 1.18\%$ en la DMO de columna lumbar y un $2.92 \pm 1.38\%$ en la del cuello femoral. Estos resultados nos parecieron alentadores comparados con los resultados obtenidos con los tratamientos por vía oral: Valkema ¹⁸ halló un incremento en la DMO de cuello femoral del 3.1% en 24 pacientes tratados con 150mg/día de pamidronato durante 3.7 años. Fromm ¹⁹, en un tratamiento continuó con dosis de 4.8 a 6 mg/kg, un incremento de la DMO en columna de $5.3 \pm 1\%$ a los 18 meses. Finalmente en un trabajo reciente ²⁰, 120 mujeres tratadas con 200 mg/día de APD oral por un período de 6 años, incrementaron su DMO en columna lumbar 4.1% y en cuello femoral 1.5%.

En este trabajo nosotros incrementamos el número de pacientes a 34 y el periodo de tratamiento se extendió a tres años. El análisis de las densitometrías anuales mostró un aumento progresivo de la densidad mineral en columna de hasta un 8% en aquellas pacientes que completaron los tres años de tratamiento y un aumento del 3.8% en cuello femoral al final del primer año, con persistencia de los valores de DMO en esta región hasta el tercer año.

Con respecto a los parámetros bioquímicos, el pamidronato intravenoso indujo una declinación en los parámetros de recambio óseo, acompañado de un aumento de los niveles de PTH ya a los seis meses y mantenidos hasta el final del seguimiento.

Como en los trabajos previos, la medicación fue bien tolerada, sólo seis pacientes experimentaron efectos adversos menores que no requirieron discontinuar la medicación.

Teniendo el número de nuevas fracturas como parámetro de evaluación del tratamiento, sólo se constató una nueva fractura durante todo el período de tres años.

Con respecto al régimen de administración de la droga, nuestros resultados son concordantes con los de un trabajo reciente ⁷. En este estudio, sus autores no encontraron diferencias en la respuesta obtenida con 120 mg en una administración anual o cuando esa misma dosis era infundida en dos goteos semestrales o cuatro trimestrales.

Basados en los resultados obtenidos en este estudio, concluimos que el APD IV es una alternativa útil y segura para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica.

Bibliografía

1. Marcus, R.; Wong, M.; Heath III, H. y col. Antiresorptive treatment of postmenopausal osteoporosis: comparison of study designs and outcomes in large clinical trials with fracture as an endpoint. *Endocrine Review* 2002; 23: (1)16-37.
2. Spivacow, F.R.; Zanchetta, J.R.; Kerzberg, E.M. y col. Tolerability of oral Pamidronate in elderly patients with osteoporosis and other metabolic bone diseases. *Curr Ther Res* 1996; 57: 1233.
3. Fromm, G.; Vega, E.; Galich, A. Side effects verified during treatment of 228 cases of involutional osteoporosis with Pamidronate. *Bone Miner* 1992; (Suppl): S17 (Abstract).
4. Thiébaud, D.; Burckhardt, P.; Kriegbaum, H. y col. Monthly Intravenous Injections of Ibandronate in the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *Am J Med* 1997; 103: 298-307.
5. Lamy, O.; Sandini, L.; Burnand, J. y col. Four years intravenous injection of Ibandronate in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis Int* 2000; 11 (Suppl 2): S188 (Abstract).
6. Reid, I.R.; Brown, J.P.; Burckhardt, P. y col. Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2002; 346: 53-61.
7. Lamy, O.; Pache, I.; Fatio, S. y col. Effect of various Doses of Pamidronate with constant yearly dose in women with osteoporosis: a 2-year pilot study. *Osteoporosis International* 2002; 13: S32 (Abstract).
8. Sarli, M.; Fradinger, E.; Morillo, S. y col. Tratamiento de la Osteoporosis Posmenopáusica con Pamidronato Intravenoso en pacientes con Patología Esofagástrica. *Medicina (Buenos Aires)* 1998; 58: 446-52.
9. World Health Organization assessment of fracture risk and its application to Screening for postmenopausal osteoporosis. WHO technical report series, 1994; 843. Geneva.
10. Hanson, J. Standardization of Femur BMD. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1316-17 (Letter to the Editor).
11. Fleisch, H. Bisphosphonates-Clinical. In: Bisphosphonates in Bone Disease: From the laboratory to the patient. Ed. Fleisch Herbert, The Parthenon Publishing Group, New York 1997; p 68-151.
12. Boutsens, Y.; Jamart, J.; Esselinckx, W. y col. Primary Prevention of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis with Intermittent Intravenous Pamidronate: A Randomized Trial. *Calcif Tissue Int* 1997; 61: 266-71.
13. Rosen, H.N.; Moses, A.C.; Gundberg, C. y col. Therapy with Parenteral Pamidronate Prevents Thyroid Hormone-Induced Bone Turnover in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77 (3): 664-69.
14. Heikkinen, J.; Selander, K.; Laintinen, K. y col. Short-term intravenous Bisphosphonates in prevention of postmenopausal bone loss. *J Bone Miner Res* 1997; 12 (1): 103-10.
15. Devogelaer, J.; Boutsens, Y.; Nagant de Deuxchaines, C.A. A randomized controlled trial of APD (Disodium Pamidronate) given intravenously with and without sodium fluoride in involutional osteoporosis. In: *Osteoporosis 3*, Claus Christiansen, C Kristen (eds), Dinamarca 1990; p 1504-5.
16. Thiébaud, D.; Burckhardt, P.; Melchior, J. y col. Two Years Effectiveness of Intravenous Pamidronate (APD) versus Oral Fluoride for Osteoporosis Occurring in the Postmenopause. *Osteoporosis Int* 1994; 4:76-83.
17. Peretz, A.; Body, J.J.; Dumon, J.C. y col. Cyclical Pamidronate infusions in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas* 1996; 25: 69-75.
18. Valkema, R.; Vismans, F.J.; Papapoulos, S.E. y col. Maintained improvement in calcium balance and bone mineral content in patients with osteoporosis treated with the bisphosphonate APD. *Bone Miner* 1989; 5:183-92.
19. Fromm, G.A.; Vega, E.; Plantalech, L. y col. Differential action of Pamidronate on trabecular and cortical bone in women with involutional osteoporosis. *Osteoporosis Int* 1991; 1:129-33.
20. Zanchetta, J.R.; Spivacow, R.F.; Bogado, C. y col. Uso prolongado, hasta 6 años, de un amino-bisfosfonato oral en pacientes con osteoporosis establecida. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57 (Supl. I): 37-44.

REVISIÓN

Nuevos aspectos fisiológicos en la regulación del metabolismo del fósforo.

New physiological aspects in the regulation of phosphate metabolism.

Negri, A. L.

Instituto de Investigaciones Metabólicas, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador, Buenos Aires.

Resumen

En los últimos años un creciente número de trabajos han demostrado que existe una nueva clase de hormonas o factores proteicos cuya acción primaria es la regulación del balance del fósforo. Así se ha acuñado el nombre de fosfatóninas para describir a estos factores con actividad reguladora del fósforo. La fosfatónina mejor caracterizada hasta la actualidad es el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF 23), uno de los 22 miembros de la familia de los FGF. La longitud completa de este factor es de aproximadamente 251 aminoácidos (26 KDa) y el gen que lo codifica está localizado en el cromosoma 12p13. Los pacientes portadores de raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante presentan mutaciones en el sitio de clivaje de este factor. Tanto el FGF 23 normal como el mutado inhiben la captación de fósforo por células epiteliales renales "in vitro". La administración de FGF 23 recombinante a ratones normales induce un incremento en la fosfatúria y una disminución del fósforo sérico. Además, se ha encontrado que el FGF 23 está muy elevado en sujetos con tumores inductores de osteomalacia y que sus valores así como los del fósforo se normalizan luego de la resección quirúrgica del tumor. En los pacientes con raquitismo ligado al X, el nivel de fósforo sérico se correlacionó en forma negativa con los niveles de FGF 23, sugiriendo que en estos pacientes el FGF 23 también es el causante de la hipofosfatemia. Ya que hay evidencia reciente de que existen otros factores además del FGF 23 con actividad de fosfatónina, es probable que el conocimiento acerca de esta clase de proteínas continúe expandiéndose en el futuro.

Abstract

In recent years an increasing number of publications have described a new class of hormones or phosphate regulating proteins. The term phosphatonins has been coined to name these factors with phosphate regulating functions. The best phosphatonin characterized at present is fibroblast growth factor 23 (FGF 23) one of the 22 members of the FGF family. The full length of FGF 23 26KDa (251 amino acids) whose gene is located on human chromosome 12p13. In patients with autosomal dominant hypophosphatemic rickets missense mutations in the cleavage site of this factor has been found. The normal or mutated FGF 23 inhibits phosphate uptake by

Dirección Postal: Armando Luis Negri, Instituto de Investigaciones Metabólicas. Libertad 836 1º piso, Buenos Aires (1012) Argentina. Teléfono: (5411) 4816-6181 - Fax: (5411) 4816-0831. E-mail: negri@casasco.com.ar

Palabras clave: fosfatónina; fosfatúria; hipofosfatemia; FGF 23

Key words: Phosphatonin; Phosphaturia; hypophosphatemia; FGF 23

Recibido: 03-09-03

renal epithelial cells in vitro. The administration of recombinant FGF 23 to normal mice induces an increase in phosphaturia and a decrease in serum phosphorous levels. Very high levels of FGF 23 has been found in patients with tumors that produce osteomalacia, because of overproduction, and its serum levels as well as serum phosphorus normalizes after surgical resection of the tumor. In patients with X linked hypophosphatemia, serum phosphate levels correlated negatively with FGF 23 serum levels, suggesting that FGF 23 is also causing the hypophosphatemia in these patients. As there are recent evidences that there are other factors with fosfatonin activity appart from the FGF 23 , it is probable that in the future this class of proteins will rapidly expand.

Introducción

En la fisiología normal, el fósforo tiene diversas funciones fundamentales: 1) es un componente esencial de los ácidos nucleicos; 2) interviene en almacenamiento de energía celular a través de la formación de ATP; 3) es un factor modulador de la actividad de proteínas a través de la fosforilación; 4) es parte integral de los fosfolípidos y 5) forma parte del tejido mineralizado del organismo, el hueso.

El principal factor que determina el nivel de fósforo sérico es la excreción renal de fosfato inorgánico (Pi). La excreción renal de Pi resulta de la filtración glomerular del mismo y de su reabsorción tubular proximal. Casi todo el fósforo del plasma es ultrafiltrable excepto un 10% que se encuentra formando complejos. Para un sujeto adulto cuya filtración glomerular es de 180 l/día, se filtran 6500 mg de Pi por día; si se excretan 775 mg/día, se puede ver que el 88% del Pi es reabsorbido y solo el 12% es excretado.

El fósforo filtrado es reabsorbido mayoritariamente en el túbulo proximal, siendo aproximadamente el 60% de la carga filtrada reclamada en su porción convoluta y 15 a 20% en su porción recta. Solo una pequeña y variable porción de la carga filtrada (<10%) es reabsorbida en las porciones más distales del nefrón. Por todo lo dicho, hablar de la regulación del nivel de fósforo sérico es hablar de la regulación de la reabsorción tubular proximal de Pi.

Mecanismos celulares de transporte transepitelial de fósforo en el túbulo proximal: Sistemas de Cotransporte Na/Pi

El transporte transepitelial de fósforo inorgánico es esencialmente unidireccional e involucra la entrada por la membrana apical con ribete en cepillo, su

pasaje a través de la célula, y su salida por la membrana basolateral. La captación del Pi a nivel de la membrana apical es el paso limitante de todo el proceso de reabsorción y es el sitio más importante de regulación ¹. La entrada de fosfato al túbulo proximal es mediada por transportadores de fosfato dependientes de sodio localizados en la membrana apical que a su vez dependen del gradiente de sodio creado por la Na/K ATPasa que se encuentra en la membrana basolateral para movilizar el proceso de transporte. El cotransporte Na/Pi es muy sensible a los cambios de pH, incrementándose de 10 a 20 veces cuando el pH se eleva de 6 a 8,5. Ésto refleja no sólo el transporte preferencial de la forma bivalente de fosfato sino también la acción de los protones sobre el cotransporte. Por lo menos dos sistemas cinéticamente diferentes de cotransporte Na/Pi han sido identificados en la membrana apical del túbulo proximal: uno de alta capacidad y baja afinidad, que se encuentra solo en la porción convoluta y que es responsable del grueso del transporte de fosfato proximal y otro sistema de baja capacidad y alta afinidad, que se encuentra tanto en la porción convoluta como en la recta y que es responsable de la reabsorción residual de fosfato. Este disposición topográfica de dos sistemas de cotransporte en serie permite una reabsorción altamente eficiente de fosfato por el túbulo proximal ².

Se han identificado tres tipos no relacionados de cotransportadores Na/Pi en mamíferos: el tipo I (Npt1) y el tipo II (Npt2) y tipo III ^{3,4}. El tipo I de cotrasportador está localizado en el ribete en cepillo de las células tubulares proximales. La función del cotransportador Na/Pi tipo I no está claramente establecida, y se sugiere que mediaría el transporte de cloro y de aniones orgánicos. El tipo II de cotransportadores Na/Pi se expresan en la membrana apical de los epitelios absortivos/resortivos, existen tres subtipos: el IIa, el IIb y el IIc. El transcrip-

to tipo IIa se expresa a en el túbulo renal proximal del riñón adulto y el tipo IIc en el riñón del animal joven, y ninguno de los dos se detecta en el intestino. El tipo IIb se expresa en el intestino delgado y las células alveolares de tipo II pero no se expresa en el riñón. El tipo II de cotransportadores Na/Pi median el cotransporte electrogénico de sodio y fosfato con una estequiometría de tres iones de sodio por uno de fosfato. El tipo IIa de cotransportador Na/Pi parece ser el determinante más importante de cotransporte sodio fosfato proximal y de la tasa global de reabsorción tubular de fósforo ⁵. La disrupción del gen *Npt2* que codifica este cotransportador, resulta en fosfaturia, en la pérdida de aproximadamente el 80% de la tasa de cotransporte Na/Pi, y en una falta de respuesta de la reabsorción tubular de fosfato a dos de los más importantes mecanismos regulatorios: la inhibición inducida por la parathormona (PTH) y a la estimulación de la reabsorción provocada por la deprivación dietética de fosfato.

Tipos de regulación del cotransportador Na/Pi tipo IIa

Existe una diferencia fundamental en la regulación de los tipos IIa y IIb de cotransportadores sodio fosfato. En el riñón donde está localizado el cotransportador tipo IIa existen mecanismos regulatorios rápidos (mediados por PTH, otras hormonas peptídicas y por la ingesta dietaria de fósforo) y lentas (reguladas por la demanda de fosfato por el crecimiento y desarrollo). En contraste en el intestino donde está localizado el cotrasportador tipo IIb existen solo mecanismos regulatorios lentos (relacionados al aporte dietario de fósforo o a la 1-25 dihidroxivitamina D3). En los estudios "in vivo" sobre el cotransportador tipo IIa en el riñón de la rata se ha visto que este transportador es rápidamente "up" o "down" regulado a nivel del ribete en cepillo apical dentro de las 2 horas luego de ocurridos cambios agudos en el fósforo de la dieta o en la administración de PTH. El rápido incremento en el cotransportador tipo IIa en la membrana apical que sigue a la restricción dietética de fósforo ocurre independientemente de la síntesis de novo de la proteína y es sensible a la disrupción de los

microtúbulos por la colchicina, sugiriendo que la "up" regulación es mediada por la translocación dependiente del citoesqueleto apical a la membrana del ribete en cepillo de cotransportadores tipo IIa presintetizados. La rápida disminución del NPT IIa a nivel de la membrana apical luego de una carga oral de fosfato o luego de la administración de PTH se acompaña de un incremento transitorio del mismo en las regiones donde típicamente hay lisosomas, previo a su desaparición del epitelio tubular. La internalización del NPT IIa ocurre principalmente en las hendiduras intermicrovellositarias y colocalizan en estructuras de membrana que contienen proteína adaptadora 2 y claritina; los cotransportadores entonces viajan en pequeñas y grandes vesículas endocíticas hasta alcanzar los lisosomas donde son degradados.

El factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF 23)

Dada la gran diversidad de funciones del fósforo, sería de esperar que el organismo tuviera un sistema de regulación especial para este anión. Sin embargo por años se creyó que el mantenimiento de la homeostasis del fósforo era llevada a cabo por las hormonas calciotrópicas clásicas, el eje PTH/calcitriol, como una acción colateral. En los últimos años un creciente número de trabajos han demostrado que existe una nueva clase de hormonas o factores proteicos cuya acción primaria es la regulación del balance del fósforo. Así se ha acuñado el nombre de fosfatoninas para describir a factores con actividad reguladora del fósforo. Recientemente, se ha caracterizado una de estas fosfatoninas, el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF 23).

La comprensión de la fisiopatología de los trastornos de pérdida de fosfato se ha ampliado recientemente con los estudios de un trastorno genético denominado raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (del inglés Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets o ADHR). Los individuos afectados de ADHR se caracterizan por tener una pérdida renal aislada de fósforo con concentraciones de calcitriol sérico inapropiadamente normales ⁶. El ADHR presenta una penetrancia variable e incompleta. En general los individuos afectados se presentan en dos subgrupos. Un subgrupo está constituido por pacientes que presentan con pérdida de

fosfato tanto en la adolescencia como en la adultez. Estos individuos se quejan de dolor óseo, debilidad, fatiga muscular y fracturas pero no tienen deformidades en las extremidades inferiores y en general son del sexo femenino. El segundo subgrupo está constituido por individuos que presentan pérdida de fosfato durante la niñez, con raquitismo y deformidad de las extremidades inferiores con un patrón similar a la presentación clásica del raquitismo ligado al cromosoma X. En algunos miembros de este subgrupo que presentan raquitismo y pérdida de fosfato durante la niñez, la pérdida urinaria de fósforo desaparece al llegar a la pubertad.

Usando estrategias de posicionamiento clonal el consorcio de estudio de ADHR observó en 4 familias con ese trastorno mutaciones con sentido erróneo en el gen que codifica el FGF 23, un miembro de la familia de los factores de crecimiento fibroblástico (en inglés fibroblast growth factor, FGF) ⁷. El gen que codifica este factor está localizado en el cromosoma 12p13 ⁸ y es uno de los 22 miembros de la familia de los FGF ^{9,10}. La longitud completa del FGF 23 es de aproximadamente 251 aminoácidos (26 KDa). Tiene una región aminoterminal que contiene el dominio característico de los FGF y una porción carboxilo terminal de 77 aminoácidos diferente de los otros factores de crecimiento fibroblástico. Las mutaciones que se detectaron en esas familias de ADHR afectaban a las argininas posicionadas tres aminoácidos aparte (residuos 176 y 179). La repercusión que esas mutaciones tienen en la estructura del FGF 23 se aclaró cuando varios grupos de investigadores expresaron y estudiaron este factor "in vitro". Además de la proteína esperada de 30000 a 32000 de radio molecular que comprende al FGF 23 completo, se observaron dos fragmentos más pequeños. Ésto mostraba que una parte del FGF 23 secretado era procesado a dos fragmentos de 18000 y 12000 de radio molecular. El tamaño de los fragmentos y sus secuencias era consistente con un clivaje de la molécula en un sitio que contiene el motivo RXXR ¹⁰, característico del sitio de clivaje de enzimas del tipo de la proconvertasa de la familia de serinoproteasas del tipo subtilisina/Kexina. Es por ello que es probable que sean proconvertasas las enzimas responsables de la degradación del FGF 23.

Es importante señalar que las mutaciones identificadas en los pacientes con ADHR reemplazan los

residuos de arginina dentro del sitio de consenso de clivaje de la proconvertasa (R¹⁷⁶HTR¹⁷⁹). El FGF 23 presente en las familias con ADHR se expresa solamente como una proteína de 30000 a 32000 Mr "in vitro", lo que sugiere que las mutaciones impiden el procesamiento o degradación del FGF 23 ^{11,12,13}.

Todavía no se ha determinado con precisión el lugar donde se produce fisiológicamente el FGF 23 así como el tipo celular que lo produce. La información actual del sitio de producción proviene de análisis de RT-PCR (del inglés: Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction) que señalaría que los sitios donde se produce el FGF 23 serían el hígado, los ganglios linfáticos, el timo y el corazón (aunque en menor cuantía). No se ha encontrado expresión del FGF 23 en el riñón ¹⁰ y tampoco en la médula ósea ¹⁰ o en los osteoblastos.

Un tema controvertido es si el FGF 23 es catabolizado por la metaloproteasa de superficie llamada PHEX, enzima cuyo gen codificante se encuentra mutado en la forma más frecuente de raquitismo hipofosfatémico, el raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (en inglés X Linked Hypophosphatemia, XLH) ^{14,15}. Algunos han sugerido que la enzima PHEX recombinante es capaz de clivar al FGF 23 a nivel del motivo RXXR o en un sitio próximo "in vitro", ya que la mutación a nivel del sitio RXXR, sitio probable de clivaje del FGF 23, impide el procesamiento por la PHEX recombinante ¹⁶. Sin embargo otros estudios no lo han podido corroborar ¹⁷. Si la enzima PHEX realmente clivara al FGF 23, las mutaciones inactivadoras del PHEX como las halladas en el XLH, impedirían la degradación del FGF 23 y su incremento en sangre podría producir la hipofosfatemia y el trastorno en el metabolismo de la vitamina D observada en el XLH.

Todavía no se conocen cuáles son los sustratos fisiológicamente relevantes del PHEX. Recientes estudios "in vitro" indican que el PHEX recombinante es capaz de clivar a ciertos sustratos de otra de las endopeptidasas de membrana, la NEP (del inglés Neutral EndoPeptidase; endopeptidasa neutra) o nefrilisina, como el ZAAL-pNA y la leu (encefalina) ^{17,18} así como la proteína relacionada a la PTH (PTHrP) ¹⁹ y el péptido amiloide ^{1-40,18}. Estudios recientes sobre la estructura cristalina de la NEP acompañada con un inhibidor, el fosforamidón, han demostrado que el bolsillo de la enzima que se une

al sustrato en este tipo de endopeptidasas es pequeño y solo capaz de acomodar oligopéptidos²⁰. Ya que la PHEX es una enzima de una estructura tridimensional similar a la NEP es probable que la PHEX también clive sólo oligopéptidos. Eso excluiría al FGF 23 como sustrato por su gran tamaño. Podría ser entonces que la acción de la PHEX para degradar al FGF 23 fuera indirecta regulando la actividad de otra enzima que catabolizara al FGF 23, o bien que actuara directamente sobre sustratos que estimulan la biosíntesis y/o la secreción del FGF 23.

La evidencia de que el FGF 23 es un factor regulador del fósforo proviene de estudios funcionales que han demostrado que el FGF 23 inhibe el transporte de fosfato "in vitro" y que es fosfatúrico "in vivo". Bowe y col.¹⁶ demostraron que tanto el FGF 23 normal como el mutado (que se encuentra en los pacientes con ADHR) inhibe la captación de fósforo por células epiteliales renales "in vitro". La inhibición de la captación de fósforo ocurre a concentraciones pM de FGF 23 que están dentro del rango normal para la acción de otras citoquinas y factores de crecimiento. La administración de FGF 23 recombinante a ratones normales induce una pequeña pero significativa disminución del fósforo sérico y un incremento en la fosfatúria¹⁰. La exposición prolongada al FGF 23 que ocurre en la implantación de células de ovario de hamster chino, conteniendo el gen FGF 23, en ratones desnudos atómicos, induce una severa hipofosfatemia, osteomalacia y disminución de los niveles de 1,25 dihidroxivitamina D3, con disminución del mensajero de la 1 alfa hidroxilasa renal²¹. Finalmente la deficiencia de FGF 23 provocada en ratones por ablación dirigida del gen del FGF 23 resulta en hiperfosfatemia y aumentó en los niveles de 1,25 dihidroxivitamina D3, así como anomalías esqueléticas. Todo lo anterior sugiere que el FGF 23 es una verdadera fosfatona y confirma su rol esencial y no redundante en el control de la homeostasis del fósforo.

Poco se conoce todavía de los mecanismos moleculares de la acción del FGF 23. El dominio del FGF 23 que aparentemente contiene el sitio de unión a su receptor es el sector aminoterminal. Ésta es la región que posee analogía con el resto de la familia de los FGFs. El FGF 23 recombinante, en ciertas condiciones experimentales, "in vitro", actuaría directamente en el túbulo proximal a través del

receptor para FGF 3C activando el sistema de la MAP kinasa²². Esto disminuye la expresión del transportador Na/P tipo 2^a y de la 1 alfa hidroxilasa renal. Estos estudios también mostraron que el FGF 23 requiere de la heparina, cofactor que facilitaría la interacción del FGF con su receptor. Además de su unión al receptor 3C, el FGF 23 se une al receptor 2C pero no se une al receptor 1C. La distribución del receptor 3C del FGF que se expresa en el túbulo proximal y cartilago y la del receptor 2C que se expresa en los osteoblastos, es consistente con las acciones renales y esqueléticas del FGF 23^{23,24}. A pesar de todo lo dicho, la función del receptor 3C (FGFR3) como mediador de la respuesta al FGF 23 debe ser confirmada, ya que ni los estados deficientes en FGFR3 ni las mutaciones inactivadoras del mismo alteran el manejo renal del fósforo^{25,26}. La falta de estímulo del FGF 23 sobre el transporte del fósforo en células de riñón de oposum, implicaría que "in vivo" las acciones para regular el transporte del fósforo del FGF 23 podrían ser indirectas, por lo que el "blanco" de la acción del FGF 23 está por definirse.

Recientemente se han desarrollado ensayos para medir de FGF 23 en sangre. Jonsson y col.²⁷ desarrollaron un ensayo tipo ELISA que detecta la porción carboxilo terminal del FGF 23. Ya que este ELISA fue diseñado para reconocer un fragmento carboxilo terminal, FGF 23 (207-244) amida, los valores hallados parecen representar la cantidad total del FGF 23 completo y los fragmentos inactivos carboxilo terminales en circulación. Estos autores encontraron que el FGF 23 está presente en la circulación de individuos sanos, aunque a niveles bajos, consistentes con el rol fisiológico del FGF 23 en la regulación del fósforo. Además el FGF 23 estaba muy elevado en sujetos que padecían tumores inductores de osteomalacia (Tabla 1) y los valores se normalizaron luego de la resección quirúrgica del tumor. También encontraron que los sujetos con XLH, el trastorno hipofosfatémico hereditario más frecuente ligado al cromosoma X, presentaban elevaciones del FGF 23 circulante. Usando un ensayo similar Weber y col.²⁸ encontró un incremento significativo en los niveles de FGF 23 y una correlación positiva entre sus niveles y el fósforo sérico en sujetos con fallo renal terminal. Sin embargo no hallaron diferencias en los niveles circulantes de FGF 23 entre sujetos hipofosfatémicos con XLH y sujetos

Tabla 1. Tipo y causa de elevación del factor de crecimiento fibroblástico 23 en distintos desordenes hipofosfatémicos.

Desorden	Tipo de FGF 23	Causa de la elevación
ADHR	Mutado	El FGF 23 no puede ser inactivado porque la zona de clivaje esta mutada.
XLH	Normal	Alteraciones en el PHEX impiden la degradación del FGF 23.
Osteomalacia oncogénica	Normal	Sobreproducción del FGF 23 por parte de las células tumorales.
Displasia Fibrosa/MAS	Normal	Excesiva producción de FGF 23 por parte de las células "fibrosas" óseas.

ADHR: Raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante;
XLH: raquitismo hipofosfatémico ligado al X; MAS: McCune-Albright syndrome.

normales. En los pacientes con XLH, el nivel de fósforo sérico se correlacionó en forma negativa con los niveles de FGF 23, sugiriendo que en estos pacientes el FGF 23 también es el causante de la hipofosfatemia. Yamazaki y col.²⁹ desarrollaron un ELISA con dos anticuerpos monoclonales que detecta el FGF 23 completo biológicamente activo, y encontraron niveles elevados de los mismos en sujetos con osteomalacia oncogénica como en sujetos con hipofosfatemia ligada al X. En la displasia fibrosa/síndrome de McCune-Albright, otro trastorno hereditario que se asocia a hipofosfatemia en el 50%

de los pacientes, Riminucci y col.³⁰ encontraron niveles elevados de FGF 23 en los pacientes comparado con controles normales apareados por edad; además los niveles del FGF 23 estaban más elevados en los pacientes con hipofosfatemia comparado con aquellos que no la presentaban.

Conclusiones

El principal factor que determina el nivel de fósforo sérico es la excreción renal de fosfato inorgánico. La excreción renal de Pi resulta de la filtración glomerular del mismo y de su reabsorción tubular proximal mediada fundamentalmente por el cotransportador Na/Pi IIa. Hasta hace poco se creía que el mantenimiento de la homeostasis del fósforo era llevada a cabo por las hormonas calciotrópicas clásicas, el eje PTH/calcitriol, como una acción colateral. Hoy en día se ha descubierto que existe una clase emergente de factores u hormonas denominados genéricamente fosfatonas, que regulan específicamente la homeostasis de fósforo. El FGF 23 es el mejor caracterizado de ellos hasta el presente y ha demostrado tener actividad fosfática "in vitro" e "in vivo" y está alterado en diversas patologías que presentan hipofosfatemia, como el raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante, la osteomalacia oncogénica y el raquitismo ligado al X. Existe evidencia reciente de que existen otros factores con actividad de fosfatona, por lo que el conocimiento de esta clase de proteínas continuará expandiéndose en el futuro.

Bibliografía

- Berndt, T.J. and Knox, F.G. Renal regulation of phosphate excretion. In DW Selding, G Giebish (eds.) *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Raven Press, New York, NY, U.S.A. 1992, pp2511-2532.
- Walker, J.J.; Yan, T.S.; Quamme, G.A. Presence of multiple sodium-dependent phosphate transport processes in proximal brush-border membranes. *Am J Physiol* 1987; 252:F226-F231.
- Tenenhouse, H.S. and Murer, H. Disorders of renal tubular phosphate transport. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:240-247.
- Murer, H.; Hernando, N.; Forster, I. y col. Proximal tubular phosphate reabsorption: Molecular mechanisms. *Physiol Rev* 2000, 80:1373-1409.
- Murer, H.; Hernando, N.; Forster, I. y col. Molecular aspects in the regulation in inorganic phosphate reabsorption: The type IIa sodium/inorganic phosphate cotransporter as the key player. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10:555-561.
- Econs, M.J. and McEneaney, P.T. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: clinical characterization of a novel renal phosphate wasting disorder. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:674-681.
- The ADHR Consortium. Autosomal dominant

- hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet* 2000; 26:345-348.
8. Econs, M.J.; McEnery, P. T.; Lennon Fand Spencer, M.C. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is linked to chromosome 12p13. *J Clin Invest* 1997; 100:2653-2657.
 9. Powers, C.J.; McLeskey, S.W.; Wellstein, A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7:165-197, 2000.
 10. Shimada, T.; Mizutani, S.; Muto, T. y col. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6500-6505, 2001.
 11. White, K.E.; Carn, G.; Lorenz-Depiereux, B. y col. ADHR mutations stabilize FGF23. *Kidney Int* 2002; 60:2079-2086.
 12. Shimada, T.; Muto, T.; Urakawa, I. y col. Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology* 143:3179-3182, 2002.
 13. Bai, X.Y.; Miao, D.; Goltzman, D. y col. The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances in vitro biological potency. *J Biol Chem* 278(11):9843-9, 2003.
 14. Holm, I.A.; Huang, X.; Kunkel, L.M. Mutational analysis of the PHEX gene in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Am J Hum Genet* 60:790-797, 1997.
 15. The HYP Consortium. A gene (PHEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat genet* 11:130-136, 1995.
 16. Bowe, A.E.; Finnegan, R.; Jan de Beur, S.M. y col. FGF-23 inhibits tubular phosphate transport and is a PHEX substrate. *Biochem Biophys Res Commun* 284:977-981, 2001.
 17. Guo, R.; Liu, S.; Spurney, R.F. y col. Analysis of recombinant PHEX: an endopeptidase in search of a substrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E837-E847,2001.
 18. Shirota, K.; Tsubuki, S.; Iwata, N. y col. Nephrylysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptides. *J Biol Chem* 276: 21895-21901, 2001.
 19. Boileau, G.; Tenenhouse, H.S.; Desgroseillers, L. y col. Characterization of PHEX endopeptidase catalytic activity: identification of parathyroid-hormone-related peptide 107-139 as a substrate and osteocalcin, PPI and phosphate as inhibitors. *Biochem J* 355:707-713,2001.
 20. Oefner, C.; Dárcy, A.; Hennig, M. y col. Structure of human endopeptidase (Nephrylysin) complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol* 296:341-349, 2000.
 21. Shimada, T.; Yoneya, T.; Hino, R. y col. Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 (FGF23) demonstrate hypophosphatemia with low serum 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)2D] and rickets/osteomalacia [abstract] *J Bone Miner Res* 2001;16:S151.
 22. Yamashita, T.; Konishi, M.; Miyake, A. y col. Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 277:28265-28270,2002.
 23. Cancilla, B.; Davies, A.; Cauchi, J.A. y col. Fibroblast growth factor receptors and their ligands in adult rat kidney. *Kidney Int* 60:147-155, 2001.
 24. Ornitz, D.M. and Marie, P.J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 16:1446-1465, 2002.
 25. Colvin, J.S.; Bohne, B.A.; Harding, G.W. y col. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *NatGenet* 12:390-397,1996.
 26. Deng, C.; Wynshaw-Boris, A.; Zhou, F. y col. Fibroblast receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84:911-921, 1996.
 27. Jonsson, K.B.; Zahradnik, R.; Larsson, T. y col. Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia. *N Engl J Med.* 2003;348(17):1656-63.
 28. Weber, T.J.; Liu, S.; Indridason, O.S. y col. Serum FGF23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *J Bone Miner Res* 2003; 18(7):1227-34.
 29. Yamazaki, Y.; Okazaki, R.; Shibata, M. y col. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4957-4960, 2002.
 30. Riminucci, M.; Collins, M.T.; Fedarko, N.S. y col. FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *J Clin Invest* 112:683-692, 2003.

REVISIÓN

Formas moleculares de gonadotrofina coriónica humana (hCG). Impacto en su medición.

Human Chorionic Gonadotropin (hCG) molecular forms: impact on clinical measurements.

Saavedra, Mónica Susana ¹; Filgueira, Elsa Elena ²; Pessacq, María Teresa ³; Schweizer, J.R.⁴; Calcagno, María de Luján ⁵; Fenili, Cecilia Andrea ⁶.

Lab. Centro Gallego de Bs. As. ¹, Lab. Hospital Santojanni ², Lab. Pessacq ³, Lab. Hospital "B. Houssay" ⁴ Cát. de Matemática FFyB.-UBA ⁵, Lab. Bioanalítica ⁶. Buenos Aires, Argentina.

Resumen

La hCG, por ser sintetizada por el trofoblasto placentario, desde su descubrimiento ha sido considerada "la hormona del embarazo". Pero, además, es producida por la hipófisis en hombres y mujeres sanos, como así también por tumores de origen no trofoblástico. En fluidos biológicos circula una gran variedad de moléculas relacionadas a la hCG, producto de su síntesis y metabolización. El dosaje de algunas de las formas moleculares tiene potencial valor diagnóstico en diferentes patologías.

Describimos la producción de hCG en diferentes situaciones clínicas, su heterogeneidad y microheterogeneidad molecular y su implicancia en la medición de la hormona por diferentes inmunoensayos (IEs). Medimos hCG en muestras de suero correspondientes al primer trimestre de embarazo normal, con 7 IEs que emplean diferentes juegos de anticuerpos en su diseño y tienen diferente especificidad para reconocer las formas moleculares de la hormona. El análisis de concordancia de resultados de cada uno de los métodos respecto del IQMA (DPC IMMULITE hCG), nos indicó que no todos son intercambiables. Esto sería atribuible a la heterogeneidad molecular de la hormona, a la diferente especificidad de los Acs. monoclonales utilizados para el diseño de cada IE y/o a la estandarización de éstos. Es imprescindible entonces, caracterizar cada IE, examinando su capacidad para detectar las diferentes formas moleculares de la hCG que puedan tener implicancia clínica.

Abstract

The human chorionic gonadotrophyn (hCG), because of being synthesized by placental trophoblast, has been considered the pregnancy hormone. But it is also produced by hypophysis in healthy men and women, as in nontrophoblastic tumors. A wide variety of hCG related molecules circulate in biological fluids; they are the product of its synthesis and metabolization: the intact, nicked and clivated molecule, the intact and modi-

Dirección Postal: Cecilia Andrea Fenili. Tacuarí 1389 7° B. (1139) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
Teléfono 054-11-4300-2900 - e-mail: cecifenili@ciudad.com.ar

Palabras clave: Gonadotrofina Coriónica Humana, hCG, Medición, Inmunoensayo, Formas moleculares.

Key words: Human Chorionic Gonadotropin, hCG, Measurement, Immunoassay, Molecular forms.

Recibido: 26-05-03

fied free subunits, besides the degradation products (molecular heterogeneity). There are also variants with different carbohydrate composition (molecular microheterogeneity). We can find then, a wide variety of circulating fragments with molecular weight (MW) from 9.5 kD, like beta core, to 40 kD, the MW of the predominant form in the early weeks of pregnancy, that is the hyperglycosylated hCG. The proportion of the different molecular forms of hCG vary in sera samples of patients in different clinical situations: normal and Ectopic or extrauterine pregnancy, Early pregnancy loss (EPL) or biochemical pregnancy, Gestational Trophoblastic Disease, Down Syndrome screening, Quiescent Trophoblastic Disease (QTD), Unexplained Elevated hCG (UE). These two last pathologies are characterized by persistently low levels of hCG (below 50 mIU/ml), production of hCG with a low grade of glycosylation that is characteristic in the second and third trimesters of pregnancy.

Despite being widely used the methods of measuring of hCG in different clinical situations, we must take into account that the dosage of free beta subunit in serum and/or the beta core fragment in urine are more sensible markers in some types of nontrophoblastic cancers, germinal cells tumors, bladder and ovary cancer, etc. Furthermore, recent development of a test for hyperglycosylated hCG would raise the predictive value of this marker in Down Syndrome screening in second trimester.

The immunoassays (IAs) commonly used in the laboratory measuring the hCG have different abilities to recognize all molecular forms. We have compared the results of hCG dosed in sera samples corresponding to patients in the first trimester of pregnancy, obtained with seven different IAs: hCG MAIAclone (IRMA/MAIA, Biodata Diagnostic), hCG Total (ICMA, Chiron Diagnostic), Total Beta (MEIA, Abbott), Nea Tact (IRMA, DSL), HCG Immulite (ICMA, DPC), HCG STAT and HCG+ (ECLIA, Roche Diagnostic). These methods, as they use in its design different sets of antibodies, present different specificity. In normal pregnancy, the intact hCG is the predominant molecular form, but it is possible to detect all the related forms of hCG in smaller proportions. We compared values obtained with each IA with the DPC Immulite method, which would recognize all the molecular forms of hCG of clinical interest. We found significant differences between the different methods, that could be attributed to the molecular heterogeneity and microheterogeneity of hCG, the different specificity of antibodies used in each IA, the recognition in a nonequimolecular way of the different molecular forms and the problems in standardization. In short, to some causes inherent to the hormone and the specificity of the IA evaluated, and others inherent to measuring by IA, like its standardization. The characteristics of the international preparations used as reference and of the partially purified calibrators (containing different proportions of intact, cleaved, or free subunits of hCG) used by the IA manufacturers, make the hCG standardization difficult. From the point of view of diagnosis and follow up of clinical situations where the dosage of hCG is employed, all of the IAs studied are adequate for pregnancy diagnosis because a good correlation is observed among results, but the absence of agreement observed between some of them would indicate that they are not interchangeable; therefore, the monitoring of patients must be made with the same method. It is necessary, because of their different specificities, to characterize each IA, examining its ability to detect the different molecular forms of hCG that may have clinical implications.

Introducción

Desde el descubrimiento de la Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) en 1920 por Hirose ¹, y en 1928 por Aschein y Zondek ², su medición ha sido la base del diagnóstico de embarazo y se ha empleado también como marcador de tumores trofoblásticos y no trofoblásticos.

Las primeras mediciones de hCG se realizaron con ensayos basados en la determinación de su bioactividad. A partir de 1960, fueron reemplazados

por sistemas basados en la inmunorreactividad de la hormona, como inhibición de la aglutinación, fijación de complemento, radioinmunoensayo, enzimoimmunoensayo, etc. Desde un comienzo se reportaron discrepancias entre los resultados por diferentes métodos ^{3,4}. El posterior desarrollo de Anticuerpos (Acs.) monoclonales para el diseño de los inmunoensayos (IEs) incrementó la especificidad y sensibilidad pero no mejoró la comparabilidad de resultados ⁵.

El aislamiento de la hCG de fluidos biológicos y

su caracterización molecular permitieron conocer el gran espectro de las formas moleculares asociadas a ella, producto de su síntesis y posterior metabolización, y de isoformas con diferentes grados de glicosilación, que en parte explicarían las diferencias observadas en las mediciones de la hormona (Tabla 1). Hoy sabemos que algunas de las formas circulantes de hCG tienen una potencial relevancia clínica, por ejemplo la subunidad beta libre (hCG L) como marcador tumoral.

El objetivo de esta actualización es, por un lado, describir estructura, metabolismo y producción de hCG en distintas situaciones fisiopatológicas. Por otro lado, queremos plantear las dificultades inherentes a su medición a través de lo reportado en la bibliografía y de nuestra propia experiencia.

Tabla 1.

Causas de las variaciones estructurales de hCG.

- Hiper e Hipoglicosilación.
- Subunidades libres no combinadas.
- Clivaje proteolítico sin pérdida de aminoácidos en la subunidad beta (nicking).
- Degradación:
 - 1) Clivado: pérdida del CTP.
 - 2) Degradación intensiva: fragmento core.

I. Estructura

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es sintetizada por el tejido trofoblástico normal (en el embarazo) y patológico (mola hidatiforme y coriocarcinoma). Su función en el embarazo normal es mantener la esteroidogénesis del cuerpo lúteo hasta el momento en que la placenta alcance el desarrollo adecuado para tomar esta función. Asimismo es producida por algunos tumores (carcinoma testicular u ovárico de tipo germinal) ⁶ y en bajas concentraciones por hipofisis ⁷.

La hCG es una hormona de PM ~ 36.7 kD (Figura 1) que forma parte de la familia de las glicoproteínas heterodiméricas hipofisarias: LH, FSH y TSH. Estas hormonas están constituidas por dos subunidades: alfa y beta, unidas por interacciones de

carga y de tipo hidrofóbica. Presentan una gran homología estructural y similar mecanismo de acción por unión a receptores específicos de la familia de receptores con siete dominios transmembrana, con transmisión de señal Adenilato-Ciclasa-AMPC vía Proteína G estimuladora.

La subunidad alfa, común a todas ellas, está codificada por un solo gen localizado en el cromosoma 6 (p21.1-23) ⁸. En su estructura contiene 92 aminoácidos, 5 puentes disulfuro y 2 sitios de unión "N" para oligosacáridos en los residuos de asparagina 52 y 78 ⁹. La subunidad beta es la que confiere la actividad biológica específica a cada una de las hormonas glicoproteicas, presentando una alta homología entre ellas (30-80%). La localización de las cisteínas en la estructura primaria para formar los puentes disulfuro y la conservación de la secuencia aminoácida sugieren que las estructuras terciarias de hCG, LH, FSH y TSH son muy similares.

La subunidad beta de hCG está codificada por 6 genes (hCG 1, 2, 3, 5, 7 y 8) agrupados en un cluster simple en tandem y "secuencias invertidas" en el Cromosoma 19 (q13.3), al igual que el gen que codifica a la LH (8). Está compuesta de 145 aminoácidos, posee 6 puentes disulfuro, 2 sitios de uniones "N" para oligosacáridos en los residuos asparagina 13 y 30, y 4 sitios de uniones "O" para oligosacáridos en 4 serinas de la región C-terminal, entre los residuos 121 y 145. Los oligosacáridos presentes en los sitios de uniones "N" son esenciales para el correcto plegamiento de la proteína, de su unión al receptor y de su metabolismo ⁹. (Figura 1).

La hCG sólo está presente en algunos primates superiores y en el equino. Probablemente el gen que codifica para la hCG es el resultado, en la evolución, de una duplicación y mutación del gen para LH, que permite la lectura de una secuencia no codificada en su región 3'. Su transcripción origina una secuencia de 30 aminoácidos (posiciones 115-145) en la región carboxilo terminal denominado "βCTP", ausente en las gonadotropinas hipofisarias. El CTP contiene los azúcares adicionales en uniones "O", que prolongan la vida media de la hCG circulante ^{9,10,11}.

En la hCG, los oligosacáridos pueden llegar a constituir hasta el 35% de la composición o peso molecular de la hormona y le confieren una gran heterogeneidad estructural (microheterogeneidad).

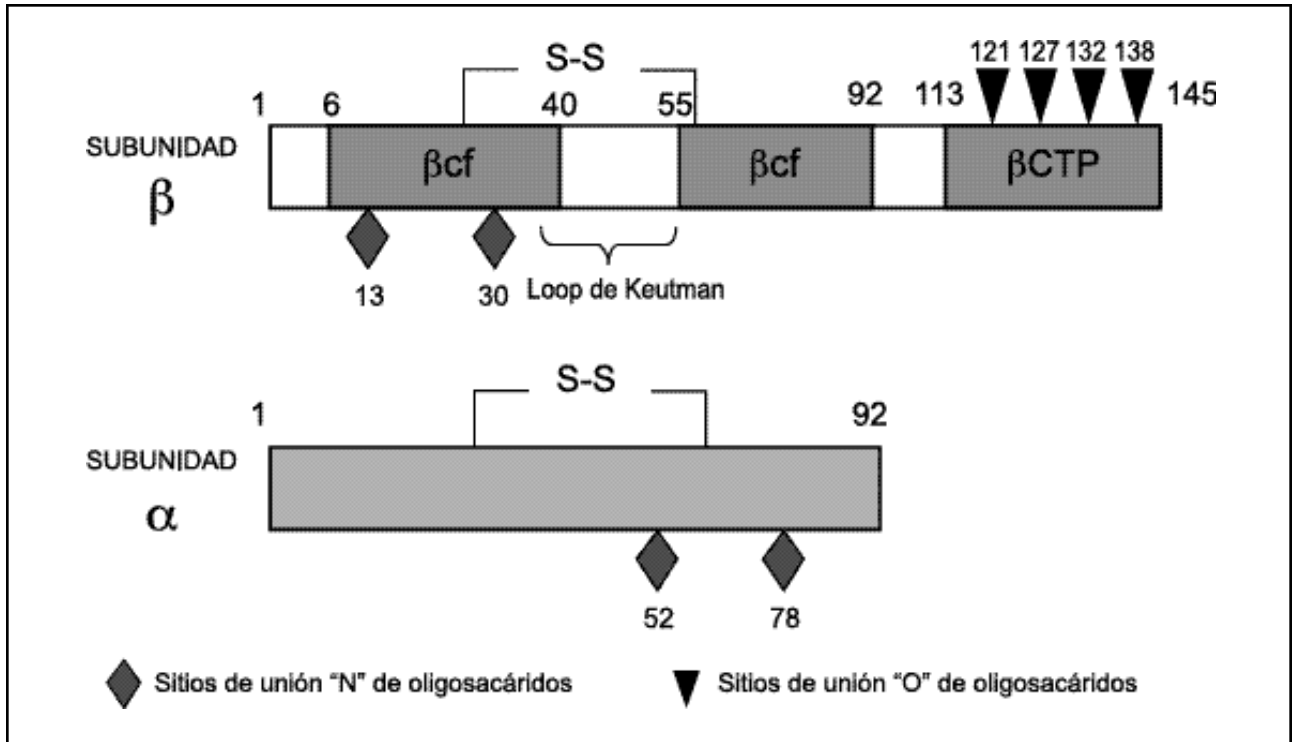


Figura 1. Esquema de la estructura molecular de hCG intacta.

La glicosilación no sólo contribuye a la funcionalidad, sino que también le otorga elasticidad a la molécula y afecta la estabilidad química de sus subunidades ^{9,12}.

II. Metabolismo

La metabolización de la hormona involucra una serie de eventos en diferentes sitios de la molécula. Se inicia con un primer paso de ruptura o corte enzimático, "nicking", sin pérdida de aminoácidos ^{13,14,15,16}, que tiene lugar en la subunidad beta (hCG), en la región denominada Loop de Keutmann (formado por unión disulfuro entre dos residuos de Cys 38-57), involucrado en la unión de la hormona al receptor y en el reconocimiento antigénico (Figura 2). La ruptura ocurre entre la posición 47-48, y menos frecuentemente en las posiciones 44-45 ó 51-52. La enzima responsable del "nicking" es una metaloproteína, la elastasa leucoci-

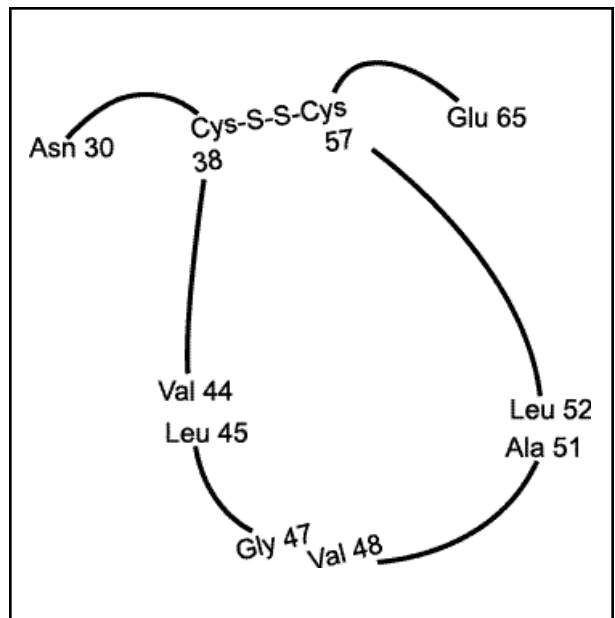


Figura 2. Loop de Keutman en subunidad beta de hCG.

taria humana que actúa tanto en tejido trofoblástico como en circulación. El sitio de acción de la enzima es el lugar de mayores interacciones hidrofóbicas y de carga entre las cadenas alfa y beta de la hormona, por lo cual esta ruptura genera la aparición de formas moleculares "nicked" (n) y la disociación del dímero ^{17,18} (Tabla 2).

En un segundo paso de metabolización, la "hCG nicked" (hCGn) y la "subunidad nicked" (hCG n) sufren un "clivado" de la molécula con pérdida parcial o total del fragmento CTP (aminoácidos 93-145); y finalmente se metaboliza en el riñón, dando por resultado el "fragmento beta core" (cf), el cual es eliminado por la orina ^{15,17}. En la Figura 3 se muestra el esquema del proceso metabólico de la hCG ¹⁹.

Tabla 2.

Efectos del "Nicking"
• Incrementa la disociación del dímero en alfa libre y en hCG Ln.
• Disminuye el reconocimiento inmunológico debido a cambios en la estructura.
• Disminuye la unión al receptor.
• Disminuye la actividad esteroideogénica.

La primera defensa contra el proceso de metabolización es la glicosilación de la hormona, ya que un mayor porcentaje de carbohidratos (formas hiperglicosiladas) aumentan su vida media en circulación y determinan su afinidad por el receptor y su clearance metabólico.

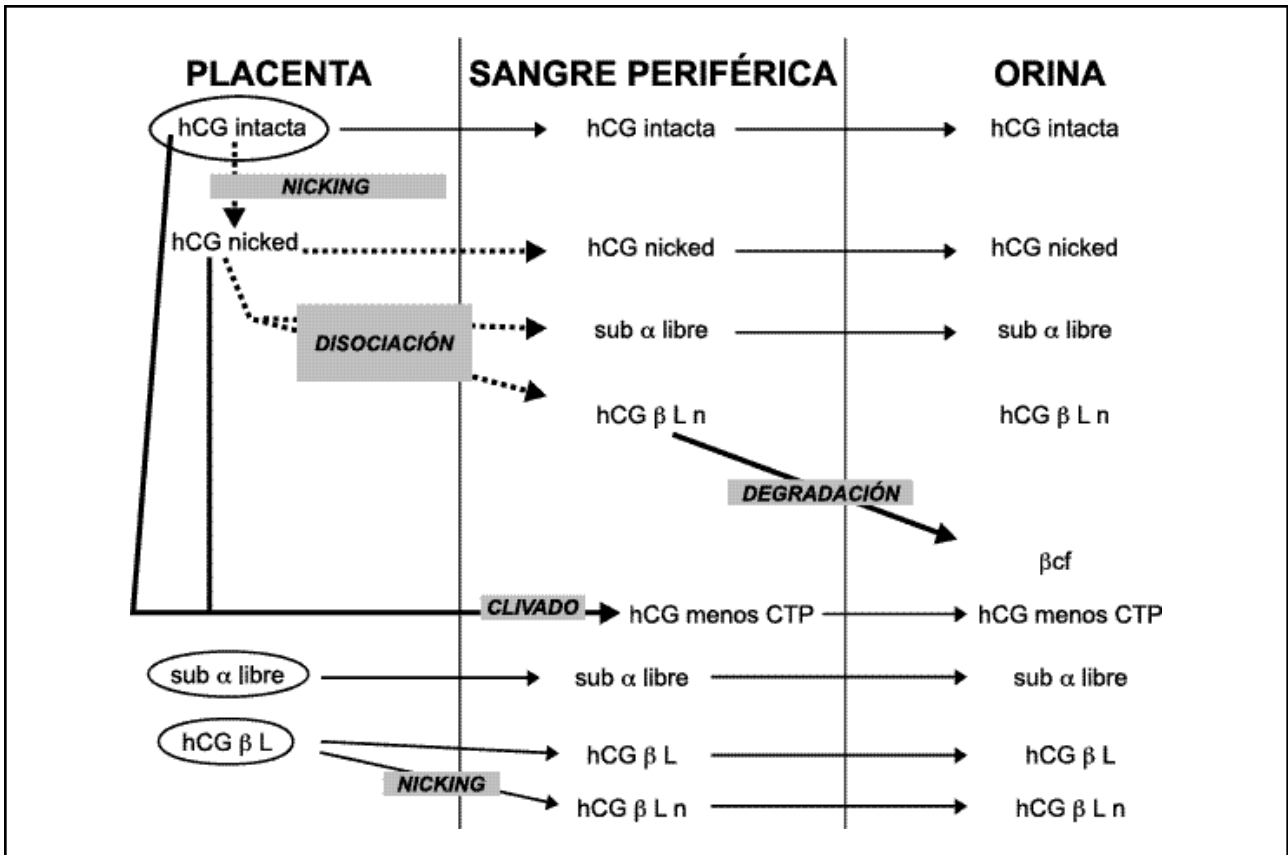


Figura 3. Formas moleculares y metabolismo de hCG.

III. Formas moleculares de hCG

Los fluidos biológicos contienen la molécula intacta, nicked y clivada, las subunidades libres intactas y modificadas y los productos de degradación, como así también otras variantes con múltiples alteraciones en la composición de carbohidratos como las formas hiperglicosiladas ²⁰.

Es decir, que encontraremos una gran variedad de fragmentos circulantes de distinto peso molecular, desde 9,5 kD (fc) hasta 40 kD (hCG hiperglicosilada). En la Tabla 3 se resumen las formas moleculares de hCG y sus características estructurales ¹⁹.

hCG Hiperglicosilada o Antígeno Trofoblástico Invasivo (ITA)

La variante hiperglicosilada de la hCG (H-hCG) es la forma predominante en las 3 semanas posteriores a la implantación del embrión; representa el 80% de la hCG producida en la primera semana, y es gradualmente reemplazada por otras isoformas, hasta alcanzar valores de entre un 25% a 1% después de la tercera semana post implantación. La presencia de esta variante en el comienzo del embarazo está relacionada al proceso de implantación e invasividad de las células trofoblásticas ^{21,22}. Una de las primeras evidencias halladas sobre el cambio de las isoformas presentes en el embarazo temprano fue la mayor carga negativa que poseían las moléculas de hCG al inicio de la gestación (determinada por electrofore-

Tabla 3. Características de la formas moleculares de hCG.

Moléculas relacionadas a hCG	Abreviatura	Estructura
hCG intacta PM= 36.5 kD	hCGi	Compuesta por dos subunidades: alfa y beta. Subunidad alfa: 92 aminoácidos, dos cadenas de oligosacáridos en los sitios de "unión N" mono o biantenarios. Subunidad beta: 145 aa, 6 sitios de unión de hidratos de Carbono (2 de unión "N" y 4 de unión "O"). Alta estabilidad. Máxima actividad biológica.
Subunidad alfa libre PM: 14 kD	hCG L	92 aminoácidos, dos cadenas de oligosacáridos en los sitios de unión "N" mono o biantenarios. Común a LH, FSH y TSH.
Subunidad beta libre PM: 23 kD	hCG L	145 aminoácidos, 6 sitios de unión de hidratos de Carbono (2 de unión "N" y 4 de unión "O").
HCG hiperglicosilada PM: 40 kD	H-hCG	35% de su PM en hidratos de carbono. En la subunidad beta predominan grandes residuos triantenarios de unión "N" y mayor contenido de hexasacáridos en uniones "O". La subunidad alfa contiene fucosa extra en las "uniones N".
hCG "nicked" PM: 36 kD	hCGn	Forma parcialmente degradada de hCG cuya cadena beta tiene un "corte o nicking" en región del "Loop de Keutmann", sin pérdida de aminoácidos.
Subunidad beta libre "nicked" PM: 23 kD	hCG Ln	Forma parcialmente degradada de la subunidad beta libre de hCG, que tiene un "corte o nicking" en región del "Loop de Keutmann", sin pérdida de aminoácidos.
hCG con pérdida de " CTP". PM: 29 kD	hCG (- CTP)	Subunidad alfa: 92 aminoácidos. Subunidad beta: aminoácidos 92-122 (el determinante " CTP" está todo o parcialmente perdido). Pierde uniones "O" de oligosacáridos. También presenta un corte o nicking en región del "Loop de Keutmann", sin pérdida de aminoácidos.
Fragmento beta core PM: 9.5 kD	fc	Subunidad beta degradada, formado por 2 péptidos (6-40 y 55-92) unidos por unión disulfuro. Forma relacionada a hCG mayoritaria en orina.

sis capilar y electro-isoenfoque)²³. Estas modificaciones se correlacionaban con una modulación de la actividad biológica, ya que durante el primer trimestre la hCG posee mayor bioactividad. Se desconocen aún los mecanismos que regulan la glicosilación de la hormona, pero podrían estar relacionados con los niveles de estradiol y progesterona, y sería éste un mecanismo de adaptación feto-madre²⁴.

En la enfermedad trofoblástica invasiva se ha descrito la producción de H-hCG o Antígeno Trofoblástico Invasivo por las células del citotrofoblasto. Probablemente, con el empleo de Acs. monoclonales y el desarrollo de equipos comerciales^{23,25,26}, la medición de H-hCG sería la forma de diferenciar enfermedad trofoblástica gestacional de tipo invasiva de la que no lo es.

Podemos inferir, entonces, que los mecanismos de modulación de la bioactividad de la hCG durante la gesta son dos: en el primer trimestre, relacionado al grado de glicosilación, y durante el segundo y tercero a la desactivación por "nicking" y posterior metabolización renal de la hormona.

IV. Producción de hCG y de moléculas relacionadas

La hCG es sintetizada por el tejido trofoblástico normal (en el embarazo) y patológico (mola hidatiforme y coriocarcinoma), por algunos tumores (carcinoma testicular u ovárico de tipo germinal) y en bajas concentraciones por hipófisis

Las formas moleculares de la hormona varían cuali y/o cuantitativamente en las distintas situaciones clínicas, por lo que es importante conocer estas variaciones y tenerlas en cuenta cuando se aplica la medición de hCG al diagnóstico de embarazo, como marcador oncológico o en el screening de Síndrome de Down (Tabla 4).

Embarazo Normal

La concentración de hCG durante la gestación comienza a aumentar en suero entre los 7 y 11 días después de la ovulación, es decir 21 a 25 días desde la fecha de última menstruación (FUM). Aumenta exponencialmente durante las primeras 5 semanas luego de la implantación, y alcanza el valor máximo en las semanas 8 a 10 desde la FUM. Después de la

Tabla 4.

Aplicaciones del dosaje de hCG.
• Detección de embarazos intra y extra uterinos.
• Predicción de aborto espontáneo.
• Diagnóstico y seguimiento de ETG y tumores de células germinales.
• Screening de Síndrome de Down.
• Diagnóstico y pronóstico de ciertas malignidades no germinales.

semana 12, comienza a descender lentamente, alcanzando niveles casi constantes desde la semana 20 hasta el término de la gesta^{19,27}. Existe una gran variabilidad individual en los niveles de hCG durante el embarazo.

La forma predominante es la hCG intacta (hCGi) tanto en suero como en orina. Además de la hCGi hay otras variantes de la hormona durante el embarazo: porcentaje bajo y variable de subunidad beta libre (hCG L) (<1% de los niveles de hCGi), hCGn (10 a 21% de hCGi) y la H-hCG. El fc sólo se encuentra en orina y su concentración varía desde una quinta parte de la hCG en el embarazo temprano hasta 5 veces la concentración de hCG a término²⁸.

Luego del parto los valores de hCG comienzan a descender, con una vida media de 24 a 32 hs, y alcanzan valores de no embarazo alrededor del día 21 posparto. Hay que tener en cuenta que luego de un aborto de primer trimestre los valores de hCG se normalizan (< 2 mUI/ml) recién luego de 4 a 5 semanas²⁹.

Pérdida temprana de embarazo

Alrededor de un 20 a 25 % del total de las concepciones culminan en un aborto temprano, donde la única evidencia de embarazo es el incremento de hCG en suero y orina a las 2 semanas de la concepción (28 días post FUM). A esto se lo denomina "embarazo bioquímico o aborto subclínico", con valores de hCG que alcanzan alrededor de 10 a 100 mUI/ml y luego caen. En la mayoría de los casos, esta pérdida temprana emula una menstruación normal o ligeramente aumentada²⁶.

La sensibilidad de los métodos actuales, tanto los de venta en farmacias (límite de detección 6-50 mUI/ml)³⁰ o los realizados en el laboratorio (con límites de detección aún menores según los métodos) permiten diagnosticar el embarazo antes de la primera falta. Por eso es recomendable efectuar los tests después del día 31 post FUM, o bien confirmarlos luego de ese plazo, para asegurar la detección de un embarazo potencialmente viable¹⁹.

Embarazo ectópico

En embarazo ectópico o extrauterino, los valores de hCG dosables son menores que los valores medios de hCG de embarazo normal. Predomina la forma hCGi tanto en suero como en orina, con muy baja proporción de productos de degradación de hCG (hCGn, hCG L y fc en orina). A pesar de que valores bajos de hCG sugieran la presencia de un embarazo ectópico, hay una significativa superposición con los valores de un embarazo normal. Teniendo en cuenta que en las primeras 8 semanas de gestación los valores de hCG deberían duplicarse cada 48 horas, la combinación de bajos valores de hCG y la inhabilidad de duplicar los valores cada 2 días es un fuerte indicador diagnóstico de embarazo ectópico^{19,27}.

Mola hidatiforme gestacional

En la enfermedad trofoblástica gestacional (ETG) la forma predominante de hCG presente tanto en suero como en orina es la intacta; hay un ligero aumento de hCG L en las pacientes con mola hidatiforme (1 a 10% del nivel de hCGi). Postevacuación, se produce un marcado descenso de hCG con aumento relativo de las formas "nicked" en respuesta al tratamiento y puede detectarse una pequeña pero significativa proporción de H-hCG (10% de los niveles de hCGi).

En enfermedad trofoblástica persistente (ETP) o mola persistente están presentes en suero y orina niveles variables de hCGi, dependiendo de la cantidad de tejido trofoblástico remanente. La ETP se asocia a una mayor proporción de hCG L (entre 2 y 10% de hCGi), alta proporción de formas "nicked" (hasta 100%) luego de la cirugía y/o quimioterapia (por metabolización de la hCGi) y, como se dijo anteriormente, mayor proporción de H-hCG (hasta aproximadamente 40% de hCG)^{19,27}.

Coriocarcinoma

En coriocarcinomas, tanto posmolares como posgestacionales, las formas "nicked" y las formas hiperglicosiladas son las variantes predominantes en suero y en orina; también, en algunos casos de coriocarcinoma, puede detectarse una alta proporción de hCG L (5 a 40% de hCGi)^{19,27}.

Enfermedad Trofoblástica Gestacional Quiescente y hCG Inexplicablemente Elevada^{19,22}.

En el año 2001 se describieron y definieron dos nuevos síndromes: Enfermedad Trofoblástica Gestacional Quiescente (ETGQ) y hCG Inexplicablemente Elevada (hCG IE).

Estos dos síndromes se caracterizan por:

- Valores persistentemente bajos de hCG (menores de 50 mUI/ml) en suero y orina, lo que descarta un falso positivo (Ver "Falsos positivos de hCG o hCG Phantom"), con mínimas fluctuaciones en períodos mayores de 6 meses a 6 años.
- Ausencia de masa tumoral o trofoblástica (al menos, no identificable por imágenes).
- Sin respuesta a la quimioterapia.
- Producción de hCG con bajo grado de glicosilación, característica del segundo y tercer trimestre de embarazo normal.

El bajo grado de glicosilación indicaría que la hCG sería producida por células altamente diferenciadas y no como las del citotrofoblasto invasor o del coriocarcinoma (poco diferenciadas), que producen altas proporciones de H-hCG. La ausencia de masa tumoral y la falta de respuesta a la quimioterapia sugieren también que los bajos niveles de hCG son producidos por células no invasivas, de crecimiento similar al del tejido normal. Podría tratarse de un único síndrome, en el que la ETGQ derivaría de una mola hidatiforme u otra ETG, y la hCG IE derivaría de un embarazo normal, ectópico o de un aborto espontáneo.

Se ha reportado³¹ un paciente con hCG IE que evolucionó luego a un tumor trofoblástico sitio placentario (TTSP), y otros pacientes en los que luego se produjo un aumento brusco de hCG con un 90% de H-hCG. Por lo cual, es muy importante el seguimiento de estos pacientes mientras persistan los valores de hCG.

Screening de Síndrome de Down^{19,21,27,32,33}

En embarazos de fetos con trisomía del par 21 (Síndrome de Down), las concentraciones de hCG heterodimérica o de hCG L duplican en promedio los valores hallados en embarazo normal de igual edad gestacional. Teniendo en cuenta la gran variabilidad individual, los valores de hCG o de hCG L no constituyen por sí solos indicadores de anormalidad genética. Su combinación con otros marcadores bioquímicos aumenta el valor predictivo de riesgo.

Los marcadores que se utilizan para el screening prenatal del primer trimestre son: hCG L, PAPP-A y translucencia nucal. En el segundo trimestre se utiliza la asociación de hCG con alfa-fetoproteína, estriol no conjugado e inhibina A. En la actualidad hay programas de computación que al ingresar los resultados de estos marcadores, junto a otros datos del paciente (edad materna, FUM), calculan la probabilidad de que el feto padezca el síndrome. A partir de estos resultados se indica la realización de estudios confirmatorios, como por ej. punción de las vellosidades coriónicas o análisis citogenético del líquido amniótico.

Un nuevo y más sensible marcador para screening de Síndrome de Down en el segundo trimestre sería la determinación de H-hCG o ITA, ya que esta forma hiperglicosilada, que durante el segundo trimestre de embarazo normal constituye menos del 3% del total de hCG, aumenta nueve veces en embarazos con Síndrome de Down²⁰.

Tumores no trofoblásticos^{19,27,34}

En algunos tipos de cánceres no trofoblásticos, tumores de células germinales (disgerminomas y tumores testiculares), cáncer de vejiga, ovario, etc., puede haber producción de pequeñas cantidades de subunidad alfa y beta de hCG que no son suficientes para su combinación y formación del dímero. En estos casos se puede detectar hCG L en baja concentración en suero y fc en orina, por lo cual estos dos parámetros constituyen marcadores más sensibles para el seguimiento de este tipo de malignidades. En su defecto, se podrían usar ensayos que miden hCG total, con capacidad de detectar también hCG L, que estará expresada en unidades de hCG.

Producción hipofisaria de hCG

Clásicamente la hCG no es considerada una hor-

mona hipofisaria, pero las células gonadotrópicas hipofisarias producen pequeñas cantidades de hCG y de fc. Hace más de dos décadas que se publicaron trabajos que describían la presencia de hCG en orina de mujeres sanas no embarazadas y la presencia de una "hCG like" en hipófisis y otros tejidos^{35,36}.

A fines de los años 80, Odell y Griffin publicaron varios trabajos sobre la pulsatilidad de la hCG en sangre durante el ciclo menstrual^{36,37,38}. Emplearon un Ac. monoclonal altamente sensible y específico, y hallaron valores más elevados de hCG en fase lútea que en folicular, y la aparición de un pico en la mitad del ciclo coincidente con el pico de LH; además, observaron el incremento de hCG junto a LH en respuesta a la administración de GnRH. Con estos trabajos se concluye el origen hipofisario de la hormona (sólo detectable con el empleo de ensayos ultrasensibles) y que ésta sería químicamente diferente de la hCG placentaria.

En 1992 Alftam y Sternman⁴⁰, con el empleo de un IFMA ultrasensible, miden la concentración de hCG, hCG L y fc en hombres y mujeres sanos (sin evidencia de cáncer) en suero y orina, y encuentran que las concentraciones de hCG son mayores en mujeres no embarazadas que en hombres, que la concentración aumenta con la edad, y que se correlaciona aún más con el aumento de FSH, por supuesto sin alcanzar los valores de embarazo. Estos autores expresan la necesidad de establecer valores de referencia de hCG por edad, sexo y para cada método en particular, para el correcto empleo en el diagnóstico y seguimiento de ciertos cánceres.

Recién en 1995, Birken y col. logran aislar y caracterizar la hCG hipofisaria, que difiere de la placentaria ya que posee un mayor grado de sulfatación en sus cadenas de oligosacáridos y un menor grado de residuos de ácido siálico⁷. Una explicación para estas diferencias químicas es que la hCG hipofisaria posee un sitio de reconocimiento por la enzima Gal N Ac-transferasa que produce la sulfatación de las glicoproteínas hipofisarias. La presencia de los grupos sulfato en las moléculas de hCG hipofisaria aumenta el clereance de la hormona ya que rápidamente es eliminada de la circulación por receptores hepáticos específicos. Estos receptores de baja afinidad en el hígado permiten regular los niveles circulantes de las moléculas sulfatadas, tanto de la

hCG hipofisaria como de la LH y TSH, y mantener la pulsatilidad necesaria para ejercer su actividad biológica. En cambio, en la hCG placentaria, un mayor contenido de moléculas de ácido siálico aumenta su vida media y logra mantener el embarazo ya que es eliminada por el riñón con un clearance menos eficiente.

Finalmente, en el año 1996 Dirnhofer S. y col. demostraron la expresión del gen de la hCG en tejido hipofisario humano ⁴¹.

Es importante tener en cuenta que sólo unos pocos inmunoensayos comerciales son capaces de medir en suero las concentraciones fisiológicas de hCG de hombres y mujeres no embarazadas (ensayos inmunométricos ultrasensibles que emplean anticuerpos monoclonales), y a su vez estos ensayos no están validados para la determinación de hCG en orina.

V. Medición de hCG

Desde hace más de un siglo, la hCG es reconocida como marcador de embarazo y de tumor trofoblástico. Los primeros métodos empleados para el dosaje de esta hormona fueron ensayos biológicos, luego desplazados por métodos inmunológicos cuali y cuantitativos como las técnicas de hemoaglutinación, inhibición de la aglutinación, RIA y ensayos inmunométricos ⁴². Desde el empleo de los primeros métodos inmunológicos, en la literatura se hace referencia a resultados discrepantes (en algunos casos "aberrantes") en las mediciones de hCG ³. En primer lugar se atribuyeron a la reacción cruzada con LH, debido al uso de Acs. policlonales en el diseño de

los primeros Radioinmunoensayos ⁴, a la presencia de Acs. heterófilos ³ y al empleo de diferentes estándares para calibración ⁴³. El desarrollo de Acs. monoclonales ha aumentado la especificidad de los IEs, pero continuaron las discrepancias entre los resultados obtenidos por diferentes métodos ^{44,45,46}. Las isoformas de hCG tienen diferentes epitopes o sitios antigénicos, los cuales a veces están presentes en todas las formas moleculares de la hormona y otras, son exclusivos de alguna de ellas (Tabla 5) ⁴⁷.

Los Acs. monoclonales utilizados en el diseño de los IEs ^{5,26,47} usan al menos uno de los Acs. dirigido contra la hCG y otro, a otro epitope estéricamente disponible. Lo importante es que según a qué epitope estén dirigidos los Acs., serán las formas moleculares que se puedan detectar. Se han desarrollado métodos con capacidad para detectar sólo la hCGi, o la hCG total (nicked y no nicked), o todas las formas moleculares relacionadas a la hCG. También hay métodos que detectan sólo la hCG L y el cf.

La mayoría de los IEs comerciales están diseñados para medir hCG y hCG , ya que estos métodos emplean dos o tres Acs. específicos para hCG o un Ac. monoclonal y un antisuero policlonal. El problema de estos IEs es que tienden a sobreestimar la hCG . Por otro lado, los IEs que emplean una combinación de Acs. anti-hCG (anti-dímero o) y anti- subestiman la hCGn.

La heterogeneidad y la microheterogeneidad molecular de la hCG, la utilización de diversos Acs. monoclonales en el diseño de los IE ¹² y las dificultades en la estandarización, son algunos de los factores que contribuyen a la complejidad de la medición de la hormona, y los posibles causantes de las discrepancias de los resultados (Tabla 6).

Tabla 5. Sitios antigénicos de las formas moleculares relacionadas a la hCG.

Características de los sitios antigénicos	Anticuerpos	hCGi	hCGn	βCTP	hCGβL	hCGβn	βcf
Epitope ubicado en la interfase de las subunidades y	Anti - hCG dímero	SI					
Epitope común a hCG y a la subunidad	Anti -	SI					
Epitope común a hCGi, hCG L, hCG n	Anti - ₁	SI	SI	SI	SI	SI	SI
Epitope común alternativo en hCGi, hCG , cf	Anti - ₂	SI	SI	SI	SI	SI	SI/NO
Epitope en hCG y hCG L (sin pérdida de CTP)	Anti - CTP	SI	SI	SI	SI	SI	
Epitope específico de la hCG L (epitope críptico de hCGi)	Anti - hCG		SI		SI	SI	

Tabla 6.

Importancia de conocer las variaciones estructurales y la estandarización de los IEs.
• Alto nivel de variaciones estructurales de hCG intraindividual y en relación a diferentes patologías
• Amplia disponibilidad de diferentes IEs tipo sandwich que usan diferentes combinaciones de Acs.
• Estandarización inadecuada, por el uso de estándares impuros.
• Interpretación de resultados en diferentes situaciones clínicas (Embarazo normal, Enfermedad Trofoblástica Gestacional, etc.)

La heterogeneidad molecular de la hCG en los fluidos biológicos causa una gran variabilidad en la inmunorreactividad. Es importante conocer la reactividad de los Acs. empleados con relación a las características del analito y del estándar. Por ejemplo, algunos Acs. reconocen la hCGi y hCGn de manera similar, mientras que otros subestiman las formas clivadas (hCG con pérdida del fragmento "CTP").

La especificidad de un IE depende de los epítopes a los que van dirigidos los Acs. empleados. Dado que se dispone del mapeo antigénico de la hCG, es factible obtener Acs. monoclonales de especificidad predeterminada para ser empleados en el diseño de los IEs comerciales. En el reciente Workshop de hCG ⁴⁸ se aconsejó el empleo de Acs. dirigidos a los epítopes 1, 2, 4 que permitirían la mejor caracterización de los IEs, y mejorar su estandarización a través del reconocimiento de mayor número de formas moleculares relacionadas a hCG.

Estandarización

Uno de los mayores inconvenientes que presentan los IEs empleados para la determinación de hCG (común a los que miden péptidos y proteínas) es su estandarización ⁵. Roger Ekins afirmó: "la estandarización de IEs sólo es posible si el estándar y el analito son idénticos; para los antígenos heterogéneos ésto es virtualmente imposible" ⁴⁹. En el caso particular de la hCG, las dificultades pueden atribuirse por un lado, a las características del estándar

dar y por el otro, a la heterogeneidad de la hCG en los fluidos biológicos.

El estándar internacional, IRP 75/537, empleado por la mayoría de los equipos comerciales, es una preparación urinaria parcialmente purificada. Se han utilizado bioensayos para determinar su potencia y se la expresó en unidades internacionales arbitrarias ⁵⁰, designándola como Preparación de Referencia Internacional (IRP), con un valor de 650 UI /vial (1µg de hCG pura = 9.3 UI). Existen reportes que afirman que esta solución de referencia contiene un 9% de hCG "nicked" y un 91% de hCGi ^{18,51}. Por consiguiente, esta solución no sería la adecuada para la calibración de los diferentes IEs.

Para el desarrollo de nuevos estándares se ha propuesto tener en cuenta ⁵²:

- Que sean calibrados por inmunorreactividad y no por bioactividad.
- Que se determine la concentración molar de la proteína pura, determinada por análisis del contenido de aminoácidos, y considerar este método como de referencia.
- Que los Acs. primarios deberán reconocer epítopes relacionados con el contenido de aa.
- Que se expresen las concentraciones en el Sistema Internacional de Unidades, según las recomendaciones de la IFCC (por ej.: mol/L).

Basados en estos conceptos y a pedido de la IFCC, un "Grupo de Trabajo" ha elaborado una nueva "Preparación de Referencia" con la finalidad de obtener resultados más comparables entre los inmunoensayos a través de la obtención de estándares puros, generando la posibilidad de expresar los resultados en concentración (mol/L) ⁵³.

Otro inconveniente relacionado a la estandarización de los IEs es atribuible a los calibradores parcialmente purificados utilizados por los fabricantes de IEs comerciales que también contienen diferentes proporciones de hCG clivada, hCG L o del cf y son preparados en base a diferentes matrices, lo cual podría generar también discrepancias en los resultados.

Falsos positivos de hCG o hCG Phantom

En los últimos años se han publicado una serie de artículos que describen la existencia de falsos positivos para hCG ("hCG Fantasma"), medidos por

métodos inmunométricos^{54,55,56,57,58,59}. Se los atribuye a la presencia, en el suero de algunos individuos normales, de anticuerpos heterófilos dirigidos contra Inmunoglobulinas de otras especies, tales como las de ratón.

Otra causa de falsos positivos de hCG es la presencia de enzimas proteolíticas, como la toxina colérica, enzimas bacterianas o un tipo de proteasa similar tripsina, que imitan a la subunidad beta de la hormona dando bajos niveles de hCG inmunorreactiva en mujeres no embarazadas^{60,61}. Tanto las enzimas proteolíticas como los Acs. heterófilos pueden interferir en el ensayo al completar la reacción "sandwich". Este tipo de inconvenientes se ha solucionado, por lo menos en parte, mediante la utilización de Acs. que unen sitios distantes de la hormona de tal forma que el ensayo sería incapaz de detectar este tipo de enzimas.

Los resultados "fantasma" de hCG pueden persistir durante muchos años, según lo reportado, y dan resultados en el rango de 10 a 630 mUI/ml. Los médicos han tenido inconvenientes en interpretar estos niveles persistentemente bajos de hCG compatibles con embarazo ectópico o ETG (mola hidatiforme o coriocarcinoma)^{56,59}. De esta forma, algunas pacientes han llegado a ser tratadas con quimioterapia y/o cirugía innecesariamente. La presencia de hCG "fantasma" debe ser considerada como una posible explicación para los niveles persistentemente bajos de la hormona en individuos sin síntomas de embarazo ni evidencia alguna de patología. Ante la sospecha de la presencia de hCG "fantasma" se recomienda realizar el siguiente protocolo¹⁹:

- Evaluar la detección de niveles de hCG en suero (10 a 630 mUI/ml) y niveles no detectables en orina (ya que los Acs. heterófilos están sólo presentes en sangre). Tampoco deberían detectarse en orina niveles de hCG L ni fc.

- Poner en evidencia resultados discordantes, de hasta 5 veces, al utilizar diferentes IEs de hCG de distintas marcas comerciales.

- Diluir la muestra sérica y, si se obtiene un resultado no coincidente con el esperado según el factor de dilución, se demuestra que lo que se está dosando no es en realidad hCG (no paralelismo).

- Utilizar agentes bloqueantes de los Acs heterófilos⁶².

VI. Comparación de resultados de hCG obtenidos con diferentes inmunoensayos

Diversos autores refieren las dificultades en la medición de hCG empleando métodos desarrollados y/o comerciales^{5,15,47}. Nosotros comparamos los resultados obtenidos por diferentes IEs empleados en nuestro medio, cuyas características se detallan en la Tabla 7, en muestras de suero correspondientes a 44 pacientes que cursaban el primer trimestre de embarazo normal. La elección de muestras del primer trimestre de embarazo normal tuvo la intención de minimizar la contribución relativa de la hCGn y la hCG L (intacta y "nicked") en los resultados a comparar. Recordamos que en el embarazo normal se encuentran en circulación todas las formas moleculares de hCG, siendo la hCGi la forma molecular predominante. El porcentaje de hCGn varía desde un 9% en primer trimestre hasta un 21% en el final de la gestación¹⁵. La concentración de la hCG L es de alrededor de un 1% de la beta total (concentraciones mayores que el 3% podrían ser indicativas de ETG). El fc, principal producto de degradación de la hCG en orina de embarazadas, es casi indetectable en suero (< 0.3% de la concentración de hCG)⁴⁶.

Por otro lado, el aumento exponencial de la concentración de hCG en suero durante el primer trimestre de embarazo normal, sumado a la gran variabilidad individual en cada semana de gestación, lleva a obtener resultados que difieren entre sí en varios órdenes de magnitud. Ninguno de los ensayos disponibles para el dosaje de hCG cubre ese amplio rango de valores y ésto obliga a efectuar diluciones para obtener el resultado final. En la Tabla 7 se incluye el rango de trabajo de cada IE utilizado en el estudio. La gran disparidad en éstos hizo imposible seguir un protocolo común de dilución para aquellas muestras que presentaron valores superiores al rango útil de trabajo de cada uno.

En una primera instancia evaluamos la correlación y concordancia (Test de Bland y Altman) de los métodos M1 a M6^{63,64}, frente al Sero MIAAclone (M1), ya que era el método más empleado en nuestro medio hasta ese momento⁶⁵. Hallamos diferencias significativas entre los métodos, observando que si bien todos los métodos presentaron buena correlación, no todos presentaron buena concordancia con M1.

Tabla 7. Características de siete IEs utilizados para la determinación de hCG.

IE	ID	Marca	Tipo de Ensayo	Dilución Automát	Rango de Trabajo (mUI/ml)	Ac de captura: Ac de marca	Especificidad	Estándar
HCG MAIAclone	M1	BIODATA DIAG.	IRMA-MAIA	NO	1-500	antihCG dimer+anti libre: anticommon 1	hCGi, hCG L, hCG Ln,	1°IRP / 3°SI 75/537
HCG Total	M2	CHIRON DIAG.	ICMA	SI	2-1.000	Anticommon 1: anticommon 2+ AntihCG dimer	hCGi, hCGn, hCG L	3°SI 75/537
Total Beta IMX	M3	ABBOTT	MEIA	SI	2-1.000	AntiCTP: anticommon 1	hCGi, hCGn, hCG L	3°SI 75/537
Nea Tact	M4	DSL	IRMA	NO	50-100.000	No especifica	hCGi	No especifica
HCG Immulite	M5	DPC	ICMA	SI	1-5.000	Anticomon 2: anticommon 1	hCGi, hCGn, hCG L, fc	3°SI 75/537
HCG STAT	M6	ROCHE	ECLIA	SI	0.5-10.000	AntihCG dimer: anticommon 1	hCGi	3°SI 75/537
HCG+	M7	ROCHE	ECLIA	SI	0.1-10.000	Anticommon 2: anticommon 1	hCGi, hCGn, hCG L, fc	3°SI 75/537

El informe del año 2002 del Centro de Referencia de hCG (USA) ¹⁹ define, entre los métodos evaluados por ellos, al DPC Immulite hCG (M5) como aquel que reconocería todas las formas moleculares de hCG de interés clínico. Esta conclusión se fundamenta en el estudio de inmunoreactividad de diferentes IEs frente a estándares puros de distintas formas

moleculares de hCG, calibrados por análisis de aminoácidos y convertidos a UI (11 UI/L = 1 µg/L).

Sobre esta base reevaluamos nuestros resultados, incluyendo en el análisis un nuevo método: Roche/Elecsys 2010 hCG+ (M7), tomando como referente al M5. Los resultados se muestran en Tabla 8. Se hallaron en este caso también diferencias sig-

Tabla 8. Inmunor reactividad de hCG en 44 muestras séricas durante el 1^{er} trimestre de embarazo normal.

ID	N	Media (mUI/ml)	DS	IC 95% de la media	Mediana (mUI/ml)	IC 95% de la mediana
M1	44	53.353	10.433	32.311-74.395	30.750	12.062-61.255
M2	44	45.034	8.564	27.762-62.172	27.383	11.906-51.253
M3	44	47.359	8.832	29.547-65.172	25.455	7.889-53.078
M4	44	33.609	6.345	20.812-46.406	19.950	9.482-41.701
M5	44	32.197	5.975	20.130-44.264	21.591	9.164-36.872
M6	44	29.812	5.574	18.570-41.054	17.483	7.729-34.445
M7	44	41.176	7.702	25.609-56.742	19.015	10.528-48.278

Tabla 9. Resultados de la comparación de los resultados de hCG por los distintos métodos vs. DPC Immulite hCG (M5).

Comparaciones	Correlación		Concordancia (Relac. cocientes de B y A)	
	<i>r</i> Pearson	<i>p</i>	Media	+/- 1.96 DE
M1 vs M5	0.9911	<0.0001	0.64	0.39-0.89
M2 vs M5	0.9864	<0.0001	0.71	0.48-0.93
M3 vs M5	0.9920	<0.0001	0.74*	0.42-1.07
M4 vs M5	0.9893	<0.0001	0.89*	0.59-1.19
M6 vs M5	0.9962	<0.0001	1.02*	0.88-1.17
M7 vs M5	0.9961	<0.0001	0.81	0.66-0.95

* concordancia estadísticamente significativa (límite de confianza incluye el valor de cociente =1 y el 98 % de los cocientes están incluidos en los 2 DE).

nificativas entre las medias correspondientes a los siete métodos, ANOVA de medidas repetidas ($F_{6;240}=21.519$; $P<0.0001$). Se halló buena correlación (r Pearson >0.98 ; $P<0.0001$ en todos los casos) entre todos los métodos y el M5 (Tabla 9). Cuando se evaluó la concordancia a través de la Relación de Cocientes de Bland y Altman, sólo se observó concordancia entre M3, M4 y M6 con el M5 (Tabla 9, Figura 4).

En nuestra primera evaluación de los resultados de hCG⁶⁵, el DPC Immulite hCG (M5) nos sorprendió por su performance similar a aquellos métodos que medían sólo hCGi y diferente de la que presentaron los que supuestamente tenían su misma especificidad para detectar las formas circulantes de la hormona. En ese momento, esas diferencias las atribuimos a la estandarización del método y/o a errores inherentes a los diferentes protocolos de dilución y diluyentes (efecto matriz)¹² empleados para lograr cuantificar valores de hCG por encima del rango útil de trabajo de los IEs. Cuando reevaluamos los métodos frente al M5, seguimos observando resultados no esperables para los IEs de igual o de distinta especificidad que éste.

La discordancia de **M1** y **M2** con M5, ambos con especificidad para el reconocimiento de todas las formas circulantes de hCG, sería atribuible, además de un problema de estandarización, al reconocimiento de manera no equimolecular de las distintas formas moleculares²². Estos métodos emplean dos Acs. específicos para hCG por lo que tienden a sobrees-

timar la hCG. Además, emplean una combinación de Acs anti-hCG (anti-dímero) y anti- que llevaría a subestimar la hCGn.

El **M3** es concordante con el M5; ambos métodos poseen igual especificidad a pesar de utilizar el M3 un anticuerpo de captura anti-CTP. De esta manera serían métodos intercambiables entre sí, pero hay que tener en cuenta los posibles falsos positivos que presenta el M3, descritos en la bibliografía⁵⁴.

La concordancia de **M4** y **M6** con M5, considerando que ambos métodos tienen especificidad sólo para detectar hCGi, se debería a que esta forma molecular es la predominante en el primer trimestre de embarazo normal (alrededor de 80% de hCG total).

El **M7** es el único método que utiliza la misma combinación de Acs. que el M5. Pero los resultados no fueron concordantes entre sí. Esto podría atribuirse a diferencias en la estandarización de los métodos, a pesar de utilizar el mismo IRP, quizás debidas al empleo de estándares secundarios con diferentes porcentajes de las formas relacionadas a hCG y a diferencias en sus matrices.

Independientemente del método elegido como patrón, al evaluar y comparar los resultados de hCG en muestras de suero correspondientes al primer trimestre de embarazo, encontramos diferencias significativas con los diferentes métodos. Pero podemos inferir que todos los IEs. estudiados son adecuados para el diagnóstico de embarazo, ya que se observa buena correlación entre los resultados. La

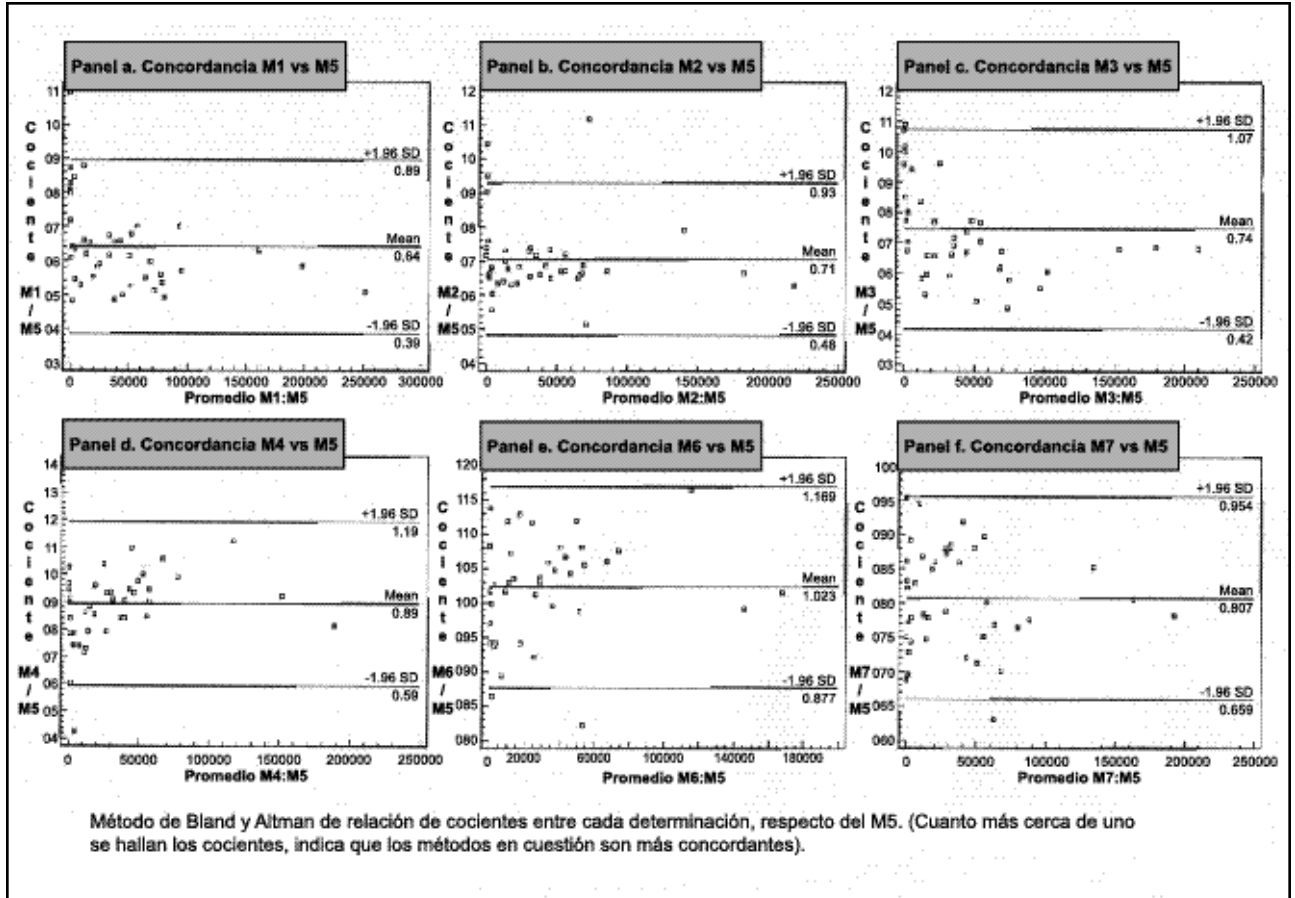


Figura 4. Relación de cocientes de Bland y Altman.

no-concordancia observada entre algunos IEs nos indicaría que éstos no son intercambiables entre sí, lo que implica la necesidad de realizar las mediciones seriadas de un mismo individuo con un mismo método.

VII. Conclusiones

En la actualidad, la medición de hCG, con el advenimiento de las nuevas y mejores metodologías, algunas totalmente automatizadas, se ha convertido en una determinación de rutina en el laboratorio clínico. A pesar de ello, los problemas en la medición persisten y siguen generando muchos interrogantes acerca de lo que realmente se está midiendo ⁶⁶.

La gran heterogeneidad molecular de la hormona en los fluidos biológicos, producto de su síntesis, metabolización y microheterogeneidad, y los diferentes Acs. monoclonales utilizados para el diseño de cada IE, pueden generar discrepancias en las mediciones. Esto no explicaría de por sí todas las diferencias observadas ya que, por ejemplo, IEs de "supuesta" igual especificidad, arrojaron resultados no intercambiables entre sí. Dificultades en la estandarización, efectos "matriz", reactividad ante Acs. heterófilos, etc., todas ellas inherentes a los IEs, también contribuyen a generar discrepancias.

En vistas al futuro, a nivel internacional se está trabajando en el desarrollo de estándares más adecuados para la hCG ⁴⁸ y cada una de sus formas moleculares, y en el desarrollo y empleo de Acs. monoclonales con especificidad predeterminada que se

utilizarán en el diseño de una nueva generación de IEs.

Las utilidades clínicas tan diversas del dosaje de hCG: diagnóstico de embarazo, de aborto espontáneo, diagnóstico y/o seguimiento de ETG y otros tumores, screening de Síndrome de Down, plantean la necesidad de caracterizar cada IE y determinar su capacidad para detectar diferentes formas moleculares de hCG que puedan tener implicancia clínica.

Es responsabilidad del laboratorio la elección del método con **utilidad clínica**, aplicable tanto en el embarazo normal y patológico como en ciertas malignidades.

Nuestra consideración final es la necesidad de solicitar a los fabricantes toda la información necesaria sobre sus productos para poder elegir el IE con el criterio más adecuado.

Bibliografía

- Hirose, T. Exogenous stimulation of corpus luteum formation in the rabbit; influence of extracts of human placenta, deciduas, fetus, hydatid mole and corpus luteum on the rabbit gonad. *J. Jpn Gynecol Soc.* 16:1055; 1920. Citado en: O'Connor J y col. Recent advances in the chemistry and immunochemistry of human chorionic gonadotropin: impact on clinical measurements. *Endocrine Reviews*; 15 (5): 650-678; 1994.
- Aschein, S.; Zondek, B. Die Schwangerschaftsdiagnose aus dem Harn durch Nachweis des Hypophysenvorderlappen-hormone. II. Praktische und theoretische Ergebnisse aus den harnuntersuchungen. *Klin Wochenschr.* 7:1453-1457; 1928. Citado en: O'Connor J y col. Recent advances in the chemistry and immunochemistry of human chorionic gonadotropin: impact on clinical measurements. *Endocrine Reviews*; 15 (5): 650-678; 1994
- Tan, J.; Taubert, H. Aberrant beta-hCG. (letter) *Fertility and Sterility*; 41(3):488-89; 1984.
- Thomas, C.; Segers, M. Discordant results for choriogonadotropin: a problem caused by lutropin beta-subunits interferences. *Clin Chem*; 31:159-60; 1985.
- Cole, L. Inmunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem.* 43: 2233-2243; 1997.
- Mann, K. Tumor markers in testicular carcinomas. *Urologe A*; 29: 77; 1990.
- Birken, S.; Maydelman, Y.; Gawinowicz, M. y col. Isolation and characterization of human pituitary chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, 137: 1402-1411; 1995.
- Grossmann, M.; Weintraub, B.; Szkudlinski, M. Novel insights into the molecular mechanisms of human thyrotropin action: structural, physiological, and therapeutic implications for the glycoprotein hormone family. *Endocrine Reviews*,18: 476-495; 1997.
- Lustbader, J.; Yarmush, D.; Birken, S. The application of chemical studies of human chorionic gonadotropic to visualize its three-dimensional structure. *Endocrine Reviews*; 14 (3): 291-311; 1993.
- Natarajan, V.; Sankaran, K.; Sylvain, M. y col. Epitope analysis and molecular modeling reveal the topography of the C-terminal peptide of beta-subunit of human chorionic gonadotropin. *Eur J. Biochem.*265, 1061-1066; 1999.
- Maston, G.A.; Ruvolo, M. Chorionic gonadotropin has a recent origin within primates and evolutionary history of selection. *Mol Biol Evol Mar*; 19(3): 320-35, 2002.
- Butler, S.; Cole, L.; Chard, T. y col. Dissociation of human chorionic gonadotrophin into its free subunits is dependent on naturally occurring molecular structural variation, sample matrix and storage. *Ann Clin Biochem*, 35:754-760; 1998.
- Kardana, A.; Elliot, M.; Gawinowicz, M. y col. The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). I. Characterization of peptide heterogeneity in 13 individual preparations of hCG. *Endocrinology*;129,3:1541-1550; 1991.
- Cole, L.A.; Kardana, A.; Andrade-Gordon, P. y col. The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). III. The occurrence and biological and immunological activities of nicked hCG. *Endocrinology* 129,3:1559-67; 1993.
- Cole, L.A.; Kardana, A.; Park, S. y col. The deactivation of hCG by nicking and dissociation. *J Clin End and Metab*, 76 N°3:704-710; 1993.

16. Kardana, A.; Cole, L. Polypeptide Nicks Cause Erroneous Results in Assay of Human Chorionic Free b- Subunit. *Clin Chem*; 38/1, 26-33; 1992.
17. Kardana, A.; Cole, L. Human chorionic gonadotropin beta-subunit nicking enzymes in pregnancy and cancer patient serum. *J Clin End and Metab*;79 N°3:761-767; 1994.
18. Birken, S.; Gawinowicz, M.A.; Kardama, A. y col. The heterogeneity of hCG: II. Characteristic and origins of nicks in hCG reference standards. *Endocrinology*, 129:1551-8; 1991.
19. www.hcglab.com (Página de internet Centro de Referencia hCG USA).
20. Elliott, M.; Kardama, A.; Lustbader, J.W. y col. Carbohydrate and peptide structure of alfa and beta subunits of chorionic gonadotropin: characteristic and variants in 32 subunit preparations from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma. *Endocrine*;7:15-32; 1997.
21. Cole, L.; Shahabi, S.; Oz, U. y col. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin (Invasive trophoblast antigen) Immunoassay: A new basis for gestacional Down Syndrome screening. *Clin Chem*; 45:12, 2109-2119; 1999.
22. Cole, L. Use of hCG test for evaluating trophoblastic diseases: choosing an appropriate hCG assay, false detection of hCG, unexplained elevate hCG and quiescent trophoblastic disease. *Gestacional Trophoblastic Disease*, 2nd edition, web publication, in press, 2002.
23. Kovaleskaya, G.; Birken, S.; Kakuma, T. y col. Early pregnancy human chorionic gonadotropin (hCG) isoforms measured by an immunometric assay for choriocarcinoma-like hCG. *J of Endocrinology*;161:99-106; 1999.
24. Mock, P.; Bischof, P.; Rivest, R. y col. Modulation of human chorionic gonadotrophin bioactivity during the first trimester of pregnancy. *Human Reproduction*; 13 N°9:2629-2632; 1998.
25. Birken, S.; Krichevsky, A.; O'Connor, J. y col. Development and characterization of antibodies to a nicked and hiperglicolylated forms of hCG from a choriocarcinoma patient: generation of antibodies that differentiate between pregnancy hCG and choriocarcinoma hCG. *Endocrine* 10(2): 137-144, 1999.
26. Lu, J.H. A direct fully automated assay for invasive trophoblast antigen (ITA) on the Nichols advantage speciality system. (Resumen) Congreso de la AACC, Orlando, FL, USA. 2002.
27. Stenman, U.; Unkila-Kallio, L.; Kohonen, J. y col. Immunoprocudures for detecting human chorionic gonadotropin: clinical aspects and doping control. *Clin Chem*; 43:7, 1293-1298; 1997.
28. Cole, L. hCG, its free subunits and its metabolites. Roles in pregnancy and trophoblastic disease. *J Reprod Med* ,43:3-10 ; 1998.
29. Kohonen, J.; Alfthan, H.; Ylostalo, P. y col. Disappearance of human chorionic gonadotropin and its and subunits after tern pregnancy. *Clin Chrm* 43:11, 2155-2163; 1997.
30. Butler, S.A.; Khanlian, S.A.; Cole, L.A. Detection of Early Pregnancy Forms of Human Chorionic Gonadotropin by Home Pregnancy Test Devices *Clin Chem*.47:2131-2136,2001.
31. Kohorn, L. Persistent low level "real" human Chorionic Gonadotropin: a clinical challenge and a therapeutic dilemma. *Gynecol Oncol*. 85(2): 315-20, 2002.
32. Sanckens, U.; Bahner, D. Comparison of Triple-Risk Assessesment of Fetal Trisomy 21 Including Total Human Choriogonadotropin (hCG) or Its Free beta-Subunit (Free betahCG). *Fetal Diagn Ther* 18(2):122-7; 2003.
33. Egan, J.F.; Benn, P. y col. Efficacy of screening for fetal Down syndrome in the United States from 1974 to 1997. *Obstet Gynecol* 96(6):979-85; 2000.
34. Dirnhofer, S.; Koessler, P.; Ensinger, C. y col. Production of trophoblastic hormones by transitional cell carcinoma of the bladder: association to tumor stage and grade. *Hum Pathol*. 29:377-382, 1998.
35. Hartree, A.S.; Shownheim, R.C.; Stevens, V.C. y col. Studies of the Human Chorionic Gonadotropin Like substance of human pituitary glands and its significance. *J Endocrinol* 96:115-126, 1983.
36. Hoermann, R.; Spoetti, G.; Moncayo, R. y col. Evidence for the presence of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) and free beta subunit of hCG in the Human Pituitary. *J Clin Endocrinol Metab*. 71:179-186, 1990.
37. Odell, W.D.; Griffin, J. Pulsatile secretion of chorionic gonadotropin during the normal menstrual cycle. *J Ciln endocrinol Metab* 69:528-532;1989.
38. Odell, W.D.; Griffin, J.; Bashey, H.M. y col.

- Secretion of chorionic gonadotropin by cultured human pituitary cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 71(5):1318-21, 1990.
39. Hammond, E.; Griffin, J.; Odell, W. D. A chorionic gonadotropin-secreting human pituitary cell. *J Clin Endocrinol Metab* 72(4):747-54, 1991.
 40. Alfthan, H.; Haglund, C.; Dabek, J. y col. Concentration of human choriogonadotropin, its beta-subunit, and the core fragment of the beta-subunit in serum and urine of men and non-pregnant women. *Clin Chem.* 38:10,1981-1987; 1992.
 41. Dirnhofer, S.; Hermann, M.; Hittmair, A. y col. Expression of the Human Chorionic Gonadotropin-b Gene Cluster in Human Pituitaries and Alternate Use of Exon 1*. *J Clin Endocrinology and Metabolism* 81, N°12: 4212-4217; 1996.
 42. Seifer, D.; Flynn, S. Aplicación clínica de la Gonadotrofina Coriónica Humana. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el Laboratorio. Henry J. B. Editorial Masson-Salvat. Barcelona (España). pp489; 1993.
 43. Stennam, U.; Birdart, J.; Birken, S. Standardization of protein immunoprocures, chorionic gonadotropic (hCG). *Scand J. Clin Lab. Invest.* 53:42-78, 1993.
 44. Kricka, L. Interferences in Immunoassay-Still a threat. *Clin Chem* 46 (8):1037-1038, 2000.
 45. Selby, C. Interferences in Immunoassay. *Ann Clin Biochem* 36:704-721, 1999.
 46. Iles, R.; Javid, M.; Gunn, L. y col. Cross-Reaction with Luteinizing Hormone -Core Is Responsible for the Age-dependent Increase of Immunoreactive -Core Fragment of Human Chorionic Gonadotropin in Women with Nonmalignant Conditions. *Clin Chem;* 45:4 532-538; 1999.
 47. Cole, L.A.; Seifer, D.B.; Kardana, A. y col. Selecting human chorionic gonadotropin immunoassays: Consideration of cross-reacting molecules in first-trimester pregnancy serum and urine. *Am J Obstet Gynecol,* 168:1580-6; 1993.
 48. Berger, P.; Sturgeon, C.; Bidart, J. y col. The ISOBM TD-7 Workshop on hCG and related molecules. Towards user-oriented standardization of pregnancy and tumor diagnosis: assignment of epitopes to the three-dimensional structure of diagnostically and commercially relevant monoclonal antibodies dire against human chorionic gonadotropin and derivatives. *Tumour Biol* 23:1-38, 2002.
 49. Ekins, R. Immunoassay standarization. *Scand J. Clin Lab Invest. Suppl* 205:33-46, 1991.
 50. Sotoring, P.L.; Gaines-Das, R.E.; Bangham, D.R. y col. International Reference Preparation of human chorionic immunotrophin for immunoassay: potency estimates in various bioassay and protein binding assay systems; and International Reference Preparations of the alfa and beta subunits of human chorionic gonadotrophin for immunoassay. *J Endocrinol;* 84:295-510; 1980.
 51. Birken, S.; Chen, Y.; Gawinowicz, M. y col. Separation of nicked human chorionic gonadotropin (hCG), intact hCG, and hCG fragment from stadard reference preparations and raw urine samples. *Endocrinology,* 133:1390-1397, 1993.
 52. Stenman, Ulf-Hakan. Immunoassay standardization: is it possible, Who is responsible;who is capable?. *Clin Chem;* 47:815-820, 2001.
 53. Birken, S.; Berger, P.; Bidart, J. y col. Preperation and Characterization of New WHO Reference Reagents for Human Chorionic Gonadotropin and Metabolites. *Clin Chem;* 49: 144-154; 2003.
 54. Cole, L.; Khanlian, S.; Butler, S. False-Positive hCG Immunoreactivity. *LabMedica International* March-April, 9-10; 2001.
 55. Cole, L.; Shahabi, S.; Butler, S. y col. Utility of Commonly Used Commercial Human Chorionic Gonadotropin Immunoassays in the Diagnosis and Management of Trophoblastic. *Clin Chem;* 47: 308-315; 2001 .
 56. Cole, L. Phantom hCG and Phantom Choriocarcinoma. *Gynecol Oncology;* 71: 325-329; 1998.
 57. Cole, L. False positive hCG immunoassay results. AACC, Orlando, 2002, abstract.
 58. Bagshawe, K. Limitations of test for human chorionic gonadotropin. *The Lancet;* 355:671; 2000.
 59. Rotmensch, S.; Cole, L. False diagnosis and needless therapy of presumed malignant disease in women with false positive human chorionic concentrations. *The Lancet;*355:712-715; 2000.
 60. Kurosky, A.; Markel, D.E.; Peterson, J.W. y col. Primary structure of cholera toxin beta-chain: a glycoprotein hormone analog? . *Science* 1977 Jan 21;195(4275):299-301.

61. Adejuwon, C.A.; Segal, S.J. Apparent chorionic gonadotropin immunoreactivity in human non-placental tissues: reduction by protease inhibitors or heat treatment. *Clin Chim Acta* 1984 Mar 13;137(3):245-53.
62. Butler, S.A.; Cole, S.A. Use of heterophilic antibody blocking agent (HBT) in reducing false positive hCG results. *Clin Chem* 47(12):2184-5; 2001.
63. Bland, J.; Altman, D. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet* Feb 8;1(8476):307-310; 1986.
64. Bland, J.; Altman, D. Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research*;8:135-160, 1999.
65. Fenili, C.; Filgueira, E.; Pessacq, M. y col. Evaluación de seis inmunoensayos (IES.) utilizados para la medición de hCG humana en primer trimestre de embarazo. *Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*; VI:34-37, 2000.
66. O'Connor, J.; Birken, S.; Lubstbader, J. Recent advances in the chemistry and immunochemistry of human chorionic gonadotropin: impact on clinical measurements. *Endocrine Reviews*. 15 (5): 650-683;1994.

“El acto más grande de humildad, de verdadera humildad, es obrar”.

MIGUEL DE UNAMUNO

INFORME DEL CACDDI-FASEN

PÁGINAS PARA RELEER:

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

Cuarta Parte (*penúltimo capítulo*):

Una ronda de reuniones y recepciones marcaron nuestra estadía en Buenos Aires. Visitamos el laboratorio de Bernardo Houssay, quien para ese entonces se había convertido en un habitante en desgracia, y donde Luis Leloir forjaba los cimientos que lo llevaron a ganar el Premio Nobel unos años después. Houssay nos agasajó con un almuerzo y nos dio un panorama gráfico de las dificultades que la ciencia médica padecía con el clima político de esos tiempos. También tuvimos una larga reunión con Juan Perón, cuya esposa recién había caído enferma. Cualquiera sean las diferencias que uno pudiera haber tenido con su visión política, era imposible negar la fuerza de su personalidad.

Pasaron meses después de nuestro retorno a Boston antes que se completaran los ensayos de laboratorio y que los datos fueran totalmente analizados. Se escribió una comunicación breve y luego, en 1954, se publicó una monografía describiendo los hallazgos (Stanbury, J.B.; Brownell, G.L.; Riggs, D.S.; Perinetti, H.; Itoiz, J.; Del Castillo, E.B.: *Endemic Goiter, The Adaptation of Man to Iodine Deficiency*, Harvard University Press, 1954). El subtítulo de ese volumen, "La Adaptación del Hombre a la Deficiencia de Yodo", enmarcó los resultados. Éstos incluyeron una rápida captación y recambio de yodo, una gran variación en el contenido glandular del mismo, un ajuste modulado a los cambios en el aporte de yodo, dependencia de la actividad tiroidea a la tirotrófina y respuesta de la actividad a la administración de yodo hormonal tiroideo, así como la acumulación y depósito cuando el yodo quedó disponible, y ausencia de un rol de los riñones para ajustar los cambios en el aporte yódico. Se construyeron modelos cinéticos de la función tiroidea y del metabolismo del yodo y se probaron con los datos obtenidos. Si bien no hubo evidencias que otras causas, aparte de la deficiencia de yodo, hayan tenido alguna participación, no se descartó la posibilidad que otros factores hubiesen estado también involucrados. Fueron sugeridas muchas alternativas para observaciones adicionales.

Dos personas jugaron un papel crucial en esta investigación. Héctor Perinetti hizo que este emprendimiento fuese posible. El proveyó las áreas de trabajo en el Hospital Central, encontró y motivó a los pacientes, se ocupó de nuestras necesidades, buscó nuestro confort y también nos escudó de los excesivos visitantes. Nunca rehusó a ningún requerimiento nuestro, aunque pareciese poco razonable. Compartió la planificación y la ejecución de muchas observaciones. Nosotros fuimos colegas e íntimos amigos, y él conserva en nuestra memoria un muy cálido lugar.

Howard Means tuvo un rol de apoyo. Él hizo los arreglos para el financiamiento y para que los investigadores norteamericanos obtuviesen la licencia para poder viajar. En años posteriores él frecuentemente aludía a la importancia de la cooperación internacional en las ciencias médicas, y citaba la experiencia de Mendoza como un ejemplo de lo que se debía hacer. Fue generoso hasta el cansancio, siempre minimizando cualquier contribución propia. Un evento feliz fue su visita a Mendoza en 1964, cuando vió el lugar del proyecto y renovó sus vínculos con Perinetti, recibiendo con gran satisfacción el título de Miembro Honorario de la Universidad de Cuyo. Uno de los hitos de aquel viaje fue un asado en la finca de Perinetti al sur de la Ciudad de Mendoza ante la vista magnífica del Cerro del Plata.

Dra. María del Carmen Silva-Croome

Dr. Hugo Niepomniszcze

Coordinadores del CACDDI-FASEN

CONTINUARÁ

Monitoreo de DDI en el sur de la Provincia de Mendoza (2000).

Hereñú, Milka *; Gabriele, V. **; Mercado, P. ***; de Eztala, Amalia ***; Bernatené, D. °; Sartorio, G. °° y Niepomniszcz, H. °°° *

* Médica Responsable de la Coordinación Local, ** Médico de San Rafael, *** Bioquímicos de la Provincia de Mendoza, ° Bioquímico del Hospital San Juan de Dios de Buenos Aires, °° 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 783 alumnos de escolaridad primaria, de ambos sexos, fue estudiado en este monitoreo de bocio endémico en tres localidades del Sur de la Provincia de Mendoza: San Rafael (209 niños), Villa 25 de Mayo (152) y General Alvear (422). La edad de los escolares osciló entre 6 y 16 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 ¹⁻⁶, 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 (183 de San Rafael, 147 de Villa 25 de Mayo y 196 de General Alvear). Se midió también el contenido de yodo en 179 muestras de sal de consumo hogareño de San Rafael, en 62 de Villa 25 de Mayo y en 408 de General Alvear. El examen palpatorio de los niños reveló solamente la existencia de bocio grado 1. La prevalencia de bocio fue diferente de acuerdo a la zona evaluada. Así, en la ciudad de San Rafael el porcentaje fue de 5,2%, indicando un insignificante grado de endemia, al igual que en General Alvear, que fue del 5,7%. Sin embargo, en la Villa 25 de Mayo, zona aledaña a la cuenca más importante de uranio de Sudamérica (Sierra Pintada), la frecuencia de bocio fue del 8,5%. Los niveles de yoduria tuvieron, en General Alvear, una \bar{x} de 115 ± 80 (DS) $\mu\text{g/L}$ y una mediana de $105 \mu\text{g/L}$; mientras que en San Rafael la \bar{x} fue de 108 ± 149 (DS) $\mu\text{g/L}$ y la mediana de $79 \mu\text{g/L}$. En la Villa 25 de Mayo la \bar{x} fue 114 ± 74 (DS) $\mu\text{g/L}$ y la mediana $94 \mu\text{g/L}$. El contenido de yodo de las sales, que los niños trajeron de sus hogares, mostró una \bar{x} de $21,3 \text{mg/kg}$ en General Alvear, $18,2 \text{mg/kg}$ en San Rafael y $14,9 \text{mg/kg}$ en la Villa 25 de Mayo. Algunas de las marcas de sal tenían una muy alta proporción de muestras cuyo contenido yódico era menor de 15mg/kg . Sin embargo, no se encontraron diferencias en las yodurias de los escolares con o sin bocio, pero sí con el tipo de sal consumida. Por estos resultados, se deduce que en las localidades estudiadas no existiría actualmente un marcado déficit de yodo, a pesar de la pobre presencia de este halógeno en muchas de las sales analizadas y también por las medianas menores a $100 \mu\text{g/L}$, observadas al medir las yodurias de San Rafael y Villa 25 de Mayo. Una encuesta nutricional fue negativa para encontrar factores alimentarios que pudieran contener bociógenos, incluyendo el agua de bebida que era de red. Concluimos que no hay bocio endémico en San Rafael y General Alvear, aunque persiste una endemia leve en la Villa 25 de Mayo. 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, no debería descartarse la posibilidad que la estrecha cercanía geográfica a los yacimientos de uranio pudiera contribuir a la leve endemia observada en la población escolar de Villa 25 de Mayo.

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.

Recibido: Febrero 2004

Introducción

Este monitoreo fue llevado a cabo dentro del marco del Programa del CACDDI patrocinado por Química Montpellier S.A., habiéndose realizado en tres localidades del sur de la Provincia de Mendoza, los días 16 y 17 de noviembre de 2000. Contó con la participación, en "terreno", de dos médicos (M.H. y V.G.) y dos bioquímicos (P.M. y A.E.), como representantes locales, mientras que del CACDDI fueron, desde Buenos Aires, un médico (H.N.) y una técnica ¹. Sus tareas fueron similares a las realizadas en los relevamientos anteriores ^{1,2,3,4,5,6}.

Materiales y Métodos

Se palpó el cuello de 209 niños de la Escuela Nro. 1-309 "Armada Argentina" de San Rafael, de 152 de la Escuela Nro. 1-013 "Bufano" de la Villa 25 de Mayo y de 422 de la Escuela Nro. 1-492 "Delia E. de Salonia" de la ciudad de General Alvear. En todas las escuelas fue equivalente el número de varones y mujeres, cuyas edades oscilaron entre 6 y 16 años.

Las palpaciones fueron realizadas por el conjunto de los médicos participantes. Sin embargo, al igual que en relevamientos anteriores ^{3,4,5,6}, 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 descrito en una publicación anterior ¹.

En la fig.1 se observa la distribución por edades de los alumnos estudiados en las tres localidades. Se determinó la yoduria en muestras casuales de orina, emitidas por los niños una vez que fueron palpados (183 de San Rafael, 147 de Villa 25 de Mayo y 196 de General Alvear). También se midió el contenido de yodo en la sal de consumo hogareño de 179 muestras de sal de San Rafael, de 62 de la Villa 25 de Mayo y de 408 de General Alvear, que los alumnos trajeron desde sus casas.

Las yodurias fueron determinadas en Buenos Aires a través 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.

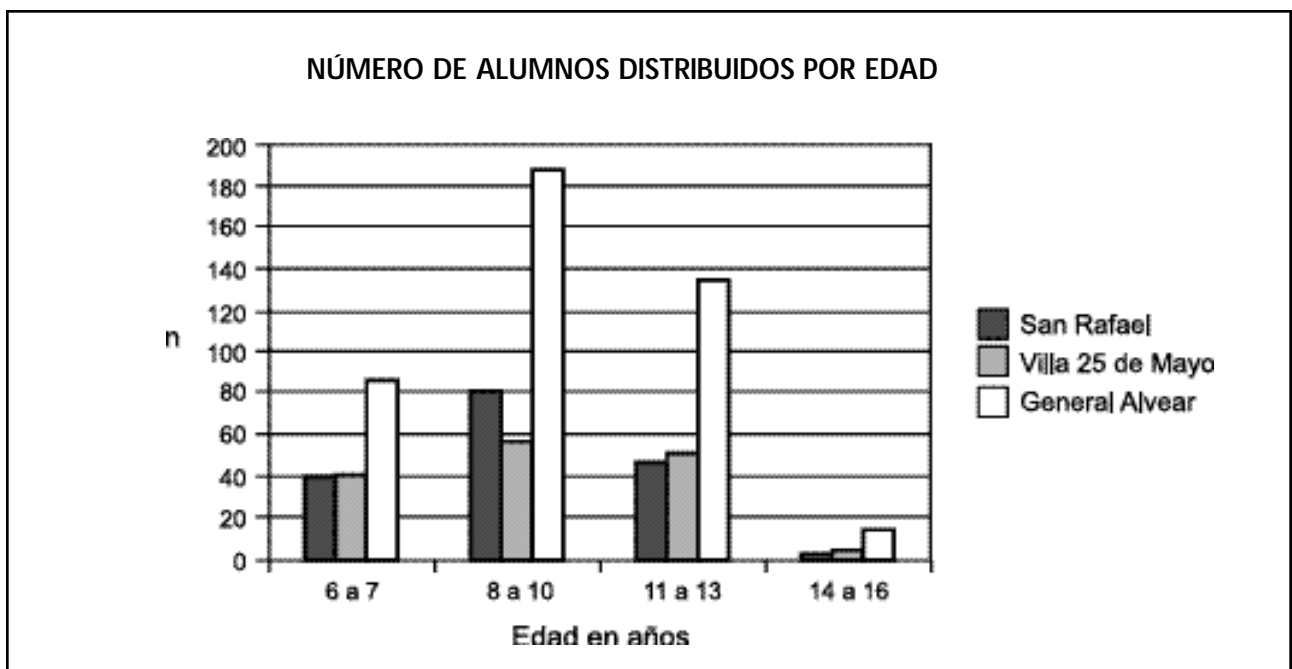


Figura 1. Distribución de alumnos por edad.

Resultados

La prevalencia de bocio fue de 5,2% en los alumnos de la Ciudad de San Rafael, mientras que en la Villa 25 de Mayo, localidad aledaña a la cuenca más importante de uranio de Sudamérica (Sierra Pintada), esta cifra se elevó al 8,5%. En la Ciudad de General Alvear, el porcentaje de bocio arrojó un valor del 5,7% (Fig.2). El examen palpatorio de los niños reveló solamente la existencia de bocio grado 1. No hubo relación alguna entre la frecuencia de bocio y la edad y sexo de los alumnos.

Yodurias:

El contenido de yodo urinario promedio de los escolares de las tres localidades estuvo en el límite inferior de la normalidad, aunque tanto en San Rafael como en la Villa 25 de Mayo el valor de las medianas fue discretamente bajo. No hubo diferencias entre los niños con o sin bocio. Los resultados hallados se observan en la tabla 1.

Contenido de yodo en la sal de consumo hogareño:

Se observó que el contenido de yodo tuvo una \bar{x}

de 21,3mg/Kg en General Alvear, 18,2mg/Kg en San Rafael y sólo 14,9mg/Kg en la Villa 25 de Mayo. Salvo una de las marcas comerciales utilizadas (Celusal®), las otras dos de consumo mayoritario (Diamante® y Dos Anclas®) contuvieron <15mg de yodo por Kg de sal en más de los 2/3 de las muestras. Esta situación contrasta negativamente con la recomendación de la ICCIDD⁷ de que solamente el 10% de las muestras de sal de consumo hogareño podría tener una concentración de yodo por debajo de la mencionada línea de corte. Aparentemente, una gran parte de las poblaciones estudiadas consume sal suelta, a pesar de que sean de marca comercial conocida. Aún así, la prevalencia de bocio fue totalmente independiente de la marca de sal utilizada. Sin embargo, el nivel de las yodurias, al analizarlas a través del valor de las medianas, mostró claras diferencias entre los niños que consumían Celusal® y aquellos que usaban Dos Anclas® o Diamante®. Los valores de estas medianas se pueden observar en la tabla 2. En la tabla 3 se muestra el consumo de sal según la marca comercial, mientras que en las tablas 4, 5 y 6 se detallan los diferentes parámetros del contenido de yodo en cada una de esas marcas, en las tres localidades estudiadas.

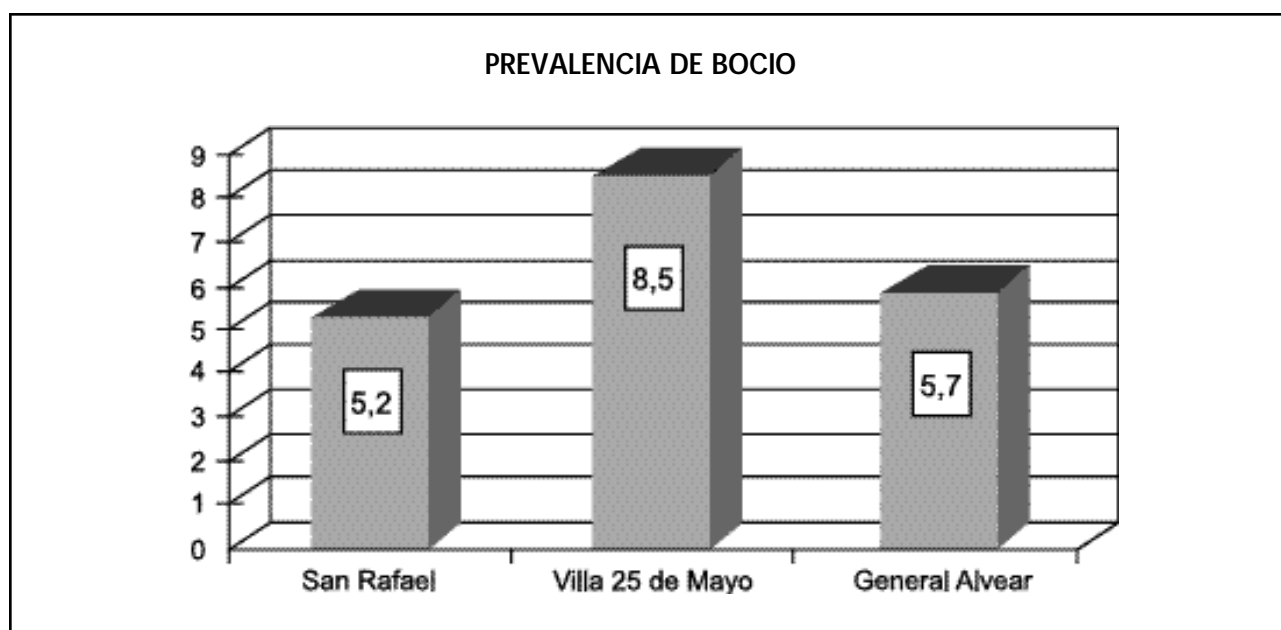


Figura 2. Prevalencia de bocio en el Sur de la Provincia de Mendoza

Tabla 1
YODURIAS EN EL SUR DE LA PROVINCIA DE MENDOZA
($\mu\text{g/L}$)

Localidad	$\bar{x} \pm \text{D.S.}$	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo	n
San Rafael	108 \pm 149	79	30	1819	183
Villa 25 de Mayo	114 \pm 74	94	30	427	147
General Alvear	115 \pm 80	105	30	506	196

Discusión

La Provincia de Mendoza fue, hasta el advenimiento de la profilaxis con sal yodada, una de las regiones argentinas más severamente afectadas por la deficiencia de yodo. Por lo tanto, no es casual que haya sido baluarte en la investigación del bocio endémico, llegando a ser la sede del primer trabajo

realizado en el mundo sobre la aplicación de los radioisótopos (^{131}I) al estudio de la endemia bociosa⁸. El sur de la Provincia fue reiteradamente monitoreado antes y después de la implementación de la profilaxis^{9,10}, que precedió en más de una década a la instaurada a nivel nacional, mediante la Ley 17259¹¹. Por tal motivo, luego de más de 40 años de consumo de sal yodada, nuestra expectativa era encontrar una zona donde el bocio endémico y la deficiencia de yodo fueran exclusivamente un recuerdo del viejo pasado, que como dice la letra del tango... “no se puede resucitar”. Sin embargo, la realidad actual no acompaña plenamente a los ideales de nuestro sueño. Si bien la situación ha mejorado dramáticamente en comparación con la época pre-profilaxis, las yodurias de los escolares de San Rafael y Villa 25 de Mayo distan de ser un ejemplo que nos deba enorgullecer. Casi con seguridad, esas yodurias guardan directa relación con el bajo contenido en yodo de dos de las marcas de sal de mayor con-

Tabla 2
MEDIANAS DE LA YODURIA SEGÚN LA MARCA DE SAL CONSUMIDA ($\mu\text{g/L}$)

Localidad	Celusal [®]	Diamante [®] o Dos Anclas [®]
Villa 25 de Mayo	106	87,5
San Rafael	87	75
General Alvear	111	98

Tabla 3
Consumo de la sal según la marca

Marca	Localidad		
	San Rafael	Villa 25 de Mayo	General Alvear
Celusal [®]	30,4 %	45,6 %	41,9 %
Dos Anclas [®]	8,3 %	16,8 %	4,4 %
Diamante [®]	59,7 %	32,9 %	53,2 %
Salitral [®]	-	-	0,2 %
Pokitin [®]	0,6 %	-	-
?	1,1 %	4,0 %	0,2 %
Sal de cuajo	-	0,7 %	-

Tabla 4
Contenido de yodo en la sal - San Rafael

Marca	Cantidad ($\bar{x} \pm$ 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 [®]	25,5 \pm 9,5	11,1	37,3	0,0 - 44,2	54
Dos Anclas [®]	8,9 \pm 11,3	80,0	127,0	0,0 - 36,1	15
Diamante [®]	15,7 \pm 20,6	63,6	131,2	0,0 - 85,7	107
Pokitin [®]	26,4	0	-	-	1
?	22,4	50	-	9,3 - 35,4	2

Tabla 5
Contenido de yodo en la sal - Villa 25 de Mayo

Marca	Cantidad ($\bar{x} \pm$ 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 [®]	27,4 \pm 9,8	13,6	35,8	0,9 - 45,1	22
Dos Anclas [®]	7,2 \pm 10,7	71,4	148,6	0,2 - 27,2	14
Diamante [®]	9,7 \pm 9,2	85,7	94,8	0,3 - 34,4	21
?	3,0 \pm 2,9	100	96,7	1,2 - 7,3	4
Sal de cuajo	2	100	-	-	1

Tabla 6
Contenido de yodo en la sal - General Alvear

Marca	Cantidad ($\bar{x} \pm$ 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 [®]	28,5 \pm 9,1	5,8	31,9	1,2 - 75,6	172
Dos Anclas [®]	8,3 \pm 10,5	83,3	126,5	0 - 33	18
Diamante [®]	16,5 \pm 20,3	66,2	123	0 - 88,2	216
Salitral [®]	69,9	0	-	-	1
?	14,7	100	-	-	1

sumo en la zona. Obviamente, nos referimos a Dos Anclas[®] y Diamante[®]. De cualquier manera, no sería lógico adjudicar a una pobre calidad de yodación, por parte de estas empresas salineras, el que la sal de consumo hogareño sea tan deficitaria en yodo. El motivo de esta aseveración se basa en el hecho de que en la mayoría de los relevamientos realizados por nosotros, hemos observado que la marca Dos

Anclas[®] tiene un nivel de yodación aceptable, mientras que la marca Diamante[®], cuando ADELCO la hizo analizar en los envases de venta al público, encontró que tenía una óptima concentración de yodo, de alrededor de 33 p.p.m.¹². Entonces, surge el planteo de que algo sucedió entre el momento de apertura de los envases de sal y su posterior consumo en los hogares desde el "salerito" doméstico.

Nuestra hipótesis es que las familias, en especial las carenciadas, suelen comprar la sal en forma suelta, de estas marcas, en los negocios minoristas de la zona, y que la exposición a la intemperie y humedad facilitan la volatilización del yodo. Sería recomendable que las autoridades bromatológicas locales tomen las medidas pertinentes para evitar la venta de sal suelta en esas regiones.

Otro punto a analizar, es la prevalencia de bocio en las tres localidades estudiadas. Salvo el caso de la Villa 25 de Mayo, que comentaremos luego, no es posible afirmar que persista el bocio endémico en San Rafael y General Alvear. Si bien es cierto que ambas localidades exceden el 5% que propone la ICCIDD ⁷, como línea de corte para definir la epidemia, el excedente es tan exiguo (sólo unos pocos decimales) que no resultaría suficiente para catalogar a esas ciudades como zonas actuales de bocio endémico. Con respecto a la Villa 25 de Mayo, la prevalencia del 8,5% de bocio es compatible con un grado de epidemia leve. Resulta difícil atribuirlo a una falta de yodo, dado que el nivel de las yodurias no difiere significativamente del encontrado en las otras dos poblaciones. Por tal motivo,

resulta necesario buscar otras causas. Posteriormente a este relevamiento, uno de nosotros (M.H.) realizó una encuesta nutricional que fue negativa para encontrar factores alimentarios que pudieran contener bociógenos, incluyendo el agua de bebida, que era de red. 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, no debería descartarse la posibilidad que la estrecha cercanía geográfica a los yacimientos de uranio pudiera contribuir de alguna forma, hasta ahora desconocida, a la leve epidemia observada en la población escolar de Villa 25 de Mayo.

Agradecimiento

Agradecemos al Sr. Mario Tomaino, 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. Spegni, S. y col. Monitoreo de DDI en la Cordillera Rionegrina (2000). *Rev. Argent. Endocrinol. Metab.*, 40: 263, 2003
7. 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
8. Stanbury, J.B.; Brownell, G.L.; Riggs, D.S. y col. *Endemic Goiter, The Adaptation of Man to Iodine Deficiency.* Harvard University Press, 1954
9. 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. y Medeiros Neto, G.A. (eds.). Pan American Health Organization, Scientific Publication No. 292, Washington D.C., USA, 1974, pág. 231*
10. Perinetti, H. y col. Results of salt iodization in Mendoza, Argentina. En: *Endemic Goiter and Cretinism: Continuing Threats to World Health: Dunn, J.T. y Medeiros Neto, G.A. (eds.). Pan American Health Organization, Scientific Publication No. 292, Washington D.C., USA, 1974, pág. 217*
11. Salvaneschi, J.P. La Ley Nacional 17259. *Rev. Argent. Endocrinol. Metab.*, 40:268, 2003
12. Giobberchio, G. Detectan irregularidades en algunas marcas de sal. *Diario Clarín (Buenos Aires)*, lunes 30 de noviembre de 2003, pág. 31