Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Copyright ® 2015 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Vol 52 • Nº 3

TRABAJO HISTÓRICO

Glándulas endocrinas y riñón*

Eduardo Braun-Menéndez

(Instituto de Biología y Medicina Experimental, Costa Rica 4185, Buenos Aires)

El conocimiento de la estructura y funciones del riñón es uno de los capítulos de la fisiología que más espectacularmente se ha desarrollado en estos últimos años. Estamos lejos aún de conocer todos los misterios de este órgano relativamente tan pequeño –pues su peso apenas representa el 0.4 a 0.5 % del peso del cuerpo– y que, sin embargo, recibe casi el 25 de la sangre que expulsa el corazón en cada latido. Esta nuestra ignorancia parcial no nos permitirá llegar, en este breve relato, a conclusiones definitivas ni a síntesis satisfactorias. Apenas mostrará la inmensa complejidad del problema y servirá de estímulo para seguir investigando. Me limitaré hoy a señalar la repercusión de ciertos factores endocrinos sobre el trofismo, las funciones globales del riñón, la excreción de agua y electrólitos y el metabolismo renal, excluyendo las acciones patológicas que algunos de estos factores endocrinos puedan ejercer.

A. ACCIÓN RENOTRÓFICA DE LAS GLÁNDULAS ENDOCRINAS

1) Hipófisis

a) *Hipofisectomía* - La extirpación del lóbulo anterior de la hipófisis determina una disminución del peso de los riñones[82,20,24,22]. La disminución del peso del riñón es proporcionalmente mucho mayor que la del peso corporal. Foglia y Houssay (1942)[20] observaron que el peso del riñón de la rata caía en quince días al 70 % y en treinta días al 45 % de su peso inicial, mientras que el peso corporal era, a los treinta días, el 88 % del peso inicial. El mecanismo de la regresión renal después de la hipofisectomía no se conoce aún. Ninguno de los varios factores incriminados: una supuesta disminución de la excreción nitrogenada (Fontaine, 1947)[22], una hipofunción tiroidea (Braun-Menéndez, 1950)[8], o una menor ingestión de alimentos, puede explicarla satisfactoriamente por sí sola.

En cuanto a la influencia de la hipofisectomía sobre la hipertrofia compensadora, a pesar de algunos resultados contradictorios[64,100,26,12,13], ha sido repetidamente demostrado que, en animales hipofisectomizados, la hipertrofia compensadora del riñón consecutiva a la nefrectomía unilateral podrá ser ligeramente menor que lo normal, pero está lejos de estar abolida[77,28,25,9]. No puede atribuirse a la hipófisis un papel trófico rector como el que ejerce con respecto a la tiroides, suprarrenales o glándulas sexuales.

b) *Administración de hipófisis* - La administración de extractos crudos[76,79], de tirotrofina[37,38,39], de somatotrofina[53], provoca una aumento del peso renal, es decir, una hipertrofia renal. La gonadotrofina parece no tener acción sobre el peso del riñón en ratas normales (Braun-Menéndez, inédito), pero favorece la hipertrofia compensadora del riñón en ratas machos entero, no pareciendo influenciarla en las hembras ni en castrados de ambos sexos (Braun-Ménéndez, inédito).

La adrenocorticotrofina tendría acción renotrófica según algunos[69] aún en animales hipofisoprivos[2], mientras otros sostienen lo contrario[80].

La presencia de un mínimo de hormona tiroidea parece ser necesaria para la acción de la somatotrofina, lo cual no implica que la acción de la hormona de crecimiento de la hipófisis se ejerza a través de la tiroides.

Un hecho interesante, que luego comentaremos, es la aparente influencia del tipo de dieta sobre la acción renotrófica de la hipófisis[37,38,23].

2) Tiroides

a) *Tiroidectomía* - La tiroidectomía quirúrgica[61,63,101,8] o por I^{131} o la administración de compuestos antitiroideos[13] produce descenso del peso

*Relato leído en la reunión anual interna de la Sociedad Argentina de Endocrinología y Enfermedades de la Nutrición, el 9 de noviembre de 1955. Recibido para su publicación el 2 de mayo de 1956.

renal. Esta regresión renal es muy acentuada en la rata, aunque no tanto como la que sucede a la extirpación de la hipófisis (Braun-Menéndez, 1950).

La tiroidectomía tampoco impide la hipertrofia compensadora[64,8,101].

b) Administración de tiroides - La administración de polvo de tiroides[61,63,8] o de tiroxina[85,79,41,16,17] produce un aumento del peso renal en ratas y produce un gran incremento en la hipertrofia compensadora[8,65,16] aun en animales hipófisoprivos[79,8].

3) Gónadas masculinas

La castración en machos reduce el peso renal en ratas[55,56] pero parece no tener efecto en el cobayo[42,50,53] y en el hamster[51].

El peso de los riñones es mayor en el macho que en la hembra en la rata[58,62] en el gasto[58,31] y en el hombre[58].

Korenchevsky y colaboradores[55,56] mostraron que la androsterona y los ésteres de la testosterona producían hipertrofia del riñón en ratas hembras castradas o enteras y en machos castrados. Estos resultados han sido ampliamente confirmados en la rata[75,59], en el ratón[5,47,53,67,75] y en el perro[6,89]. Kochakian[48,49] ha demostrado que los grupos polares en las moléculas esteroides influencian las propiedades renotróficas y androgénicas de estos compuestos. Así la presencia de un grupo hidroxilo en 3α reduce la actividad androgéncia pero no la renotrófica y el grupo ceto en 3 aumenta la actividad androgénica pero no la renotrófica y el grupo ceto en 3 aumenta la actividad androgénica sin aumentar la renotrófica. Por ejemplo: el 17 metilandrostanediol = 3α, 17α es más renotrófico que androgénico. La acción renotrófica de los andrógenos no es (como en el caso de la somatotrofina) potenciada por la tiroxina[79]. La administración de andrógenos aumenta la hipertrofia compensadora después de nefrectomía unilateral[60,32,34].

La hipertrofia renal producida por los andrógenos afecta sobre todo las células tubulares, pero también se engrosa el epitelio de la hoja parietal de la cápsula de Bowman[14,73]; el aparato yuxtaglomerular no sufre modificaciones[17].

4) Gónadas femeninas

La castración en las hembras no tiene efecto sobre el peso renal (Korenchevsky y Ross)[56].

No se ha estudiado el efecto de los estrógenos sobre el peso del riñón. Pero Schaffenburg y McCullagh (1953) dicen haber conseguido inhibición de la hipertrofia renal compensadora en ratas administrando 250 μg por día de estradiol.

5) Adrenales

La cortisona, que inhibe el crecimiento corporal en ratas, produce aumento del peso del riñón. La DCA, en cambio, no tiene acción sobre el peso corporal, pero tiene un moderado efecto sobre el peso renal[30].

La hipertrofia compensadora del riñón disminuye en ratas tratadas con cortisona 82 mg/día) o desoxicorticosterona (2 mg/día)[30,33]. Según Gross y Meier[29] la cortisona aumenta la hipertrofia compensadora, mientras las desoxicorticosterona y el compuesto S no tienen influencia.

6) Riñón

Selye y Stone[78] señalaron en sus estudios sobre el llamado "riñón endocrino" que "la mera presencia de tejido renal, quizás mediante una función endocrina, disminuye la respuesta del riñón contralateral a los estímulos renotróficos". Esta hipótesis ha recibido cierto apoyo en el trabajo de Schaffenburg, Masson y Corcoran[6] quienes hallaron que la administración de renina inhibe la hipertrofia compensadora del riñón.

B. INFLUENCIA DE LAS GLÁNDULAS ENDOCRINAS SOBRE LAS FUNCIONES RENALES

1) Hipófisis

En una serie de trabajos que comienza en 1938 y que aún no ha terminado, White y sus colaboradores han demostrado en forma clara y terminante que las funciones renales en el perro son influenciadas considerablemente por el lóbulo anterior de la hipófisis. En los perros hipofisectomizados se observa disminución del clearance de inulina (o creatinina), de urea y de diodrast (o paraaminohipurato). También disminuye apreciablemente el Tm de diodrast o de paraaminohipurato[90,91,92,93,94,96,18,68].

Esta influencia de la hipófisis no se ejerce a través de la tiroides o de la suprarrenal, pues no la impide la administración de hormonas corticales[96] ni la administración de hormona de crecimiento restituye a la normal, o aun por encima del nivel normal, la función deprimida de los perros hipofisoprivos[97].

La somatotrofina administrada diariamente a perros normales durante 9 a 12 días hace subir al doble el flujo sanguíneo y casi duplica la filtración glomerular y la masa tubular excretora[97].

La administración de ACTH produjo aumento de la filtración glomerular, disminución del flujo renal y poco cambio en el Tm en hombres normales[1]. Estos cambios pueden interpretarse como secundarios a cambios en el metabolismo hidrosalino.

2) Tiroides

La tiroidectomía quirúrgica produce en el perro una disminución del Clearance de diodrast y del Tm de diodrast con poco efecto sobre la filtración glomerular. La depresión de las funciones renales es menor que la producida por la hipofisectomía; es corregida por la administración de tiroides, es poco influenciada por la administración de extractos de lóbulo anterior de hipófisis[95]. Es sabido que los síntomas de hipotiroidismo que provoca en el perro la tiroidectomía quirúrgica son poco acentuados; convendría repetir estos estudios suprimiendo la función tiroidea en perros con I^{131} o en ratas, animal éste en que la supresión de la tiroides tiene efectos muy marcados sobre el riñón.

La administración de tiroides o de tiroxina a perros normales aumenta la filtración glomerular, el flujo renal, la masa tubular excretora y la reabsorción de glucosa[40,19,36,35].

3) Gónadas masculinas

La administración de propionato de testosterona en perras produjo un rápido aumento del Tm de diodrast de hasta un 100 %, sin mayores cambios en la filtración glomerular y el flujo sanguíneo[89]. Estos resultados no fueron confirmados por Richardson y Houck[70]. Tampoco se obtuvieron resultados positivos en el hombre[46,15].

La castración no tiene efecto sobre la filtración glomerular o el Tm en el hombre[15,72].

4) Gónadas femeninas

La administración de benzoato de estradiol en dosis de 4-6 mg/día no produjo modificaciones de las funciones renales en mujeres normales[72], aunque produjo una reducción del tm de ácido ascórbico en la mujer[15] y en el perro[72].

La ovariectomía no afecta los clearances ni el Tm en la perra.

5) Adrenales

Las profundas modificaciones en el balance hidrosalino consecutivas a la adrenalectomía dificultan el análisis de las funciones renales. En el animal no tratado se produce una rápida reducción de la filtración glomerular y de las demás funciones renales: flujo sanguíneo, Tm de excreción, de reabsorción, etc. Pero, como dice Homer Smith[81], el organismo con insuficiencia suprarrenal está en un equilibrio tan inestable y con un margen de seguridad tan pequeño para su balance hidrosalino que, si no se mantiene éste en forma perfecta, pronto cae en la deshidratación, siendo la reducción de las funciones renales simplemente efecto de la deshidratación. Por ello no trataremos este punto que, por otra parte, puede consultarse en el magnífico libro de Homer Smith, quien dedica un capítulo entero al tema (cap. XII, págs. 353-375).

C. ACCIÓN SOBRE LA EXCRECIÓN DE AGUA Y ELECTROLITOS

En mi opinión, no corresponde en este breve relato tratar de la influencia de la hormona antidiurética de la neurohipófisis sobre la excreción renal del agua, sino en forma muy somera. Es bien conocido que la neurohipófisis es una unidad fisiológica que comprende los núcleos hipotalámicos (especialmente los surpaópticos y paraventriculares), el tallo pituitario y el lóbulo nervioso de la hipófisis. La hormona antidiurética segregada por la neurohipófisis produce una disminución de la excreción de orina por aumento de la reabsorción de agua en el tubo distal. Por lo general, y siempre que no se empleen dosis demasiado elevadas, el principio antidiurético de la hipófisis no provoca cambios en la filtración glomerular o el flujo renal ni provoca necesariamente cloruresis[88,66].

Suprarrenal

La glándula endocrina que mayor influencia tiene sobre la excreción renal de electrólitos y agua es sin duda la suprarrenal. puede repetirse aquí lo que dijéramos al referirnos a la influencia de la suprarrenal sobre las funciones renales de filtración glomerular y flujo sanguíneo. Es tan importante su acción sobre el metabolismo de los electrólitos y del agua del organismo que es difícil apreciar hasta qué punto el riñón participa como factor primario en los cambios producidos por la adrenalectomía y la administración de hormonas corticales y en qué grado su función alterada es consecuencia de trastornos extrarrenales del metabolismo hidrosalino.

Parece, sin embargo, no haber duda que la adrenalectomía produce un cambio primario en la capacidad del riñón para reabsorber el sodio y el cloro. Tanto en el hombre como en el perro, el gato y la rata, el sodio y el cloro se pierden por la orina debido a la menor capacidad de reabsorción tubular para dichos electrólitos. Por otra parte, las

hormonas corticales y especialmente la aldosterona y la desoxicorticosterona, aumentan la reabsorción tubular del sodio y cloro y por tanto disminuyen su excreción. Pero también, aparte de su acción directa sobre el riñón, pueden actuar a través de cambios en la distribución de agua y electrólitos entre las fases celular y extracelular que, secundariamente, se reflejarán en modificaciones en la excreción de agua y sodio.

Considero como no probada la hipótesis de Gaunt[27], según la cual habría un antagonismo funcional entre las hormonas del lóbulo posterior y la corteza suprarrenal. Para dicho autor las hormonas corticales favorecen la excreción de agua e inhiben la excreción de sodio mientras la hormona antidiurética tiene acciones opuestas. En primer lugar, el aumento de diuresis provocado por la desocicorticosterona no es debida a una acción directa sobre el riñón, sino a cambios en la distribución del sodio en el organismo, y no se observa en ausencia de ingestión de cloruro de sodio (Braun-Menéndez)[10]. En segundo lugar, ya hemos mencionado que la administración de dosis fisiológicas de hormona antidiurética no provoca cloruresis ni natriuresis.

D. ACCIÓN SOBRE LAS ENZIMAS RENALES

El riñón es muy rico en enzimas; quizás el único órgano que pueda competir con el riñón desde el punto de vista de su riqueza en enzimas sea el hígado.

Los estudios sobre la distribución y el papel de estas enzimas en las funciones del riñón están aún en la etapa inicial. Es, por ende, prematuro y fuera de lugar exponer con detalle los hallazgos realizados. Sólo haremos mención de algunos ejemplos típicos de las influencias endocrinas sobre las enzimas renales.

a) *Fosfatasa* - Existen algunas pruebas experimentales que parecen demostrar que la absorción de glucosa por las células del tubo contorneado proximal se efectúa por fosforilación y desfosforilación sucesivas. La distribución de fosfatasa en el extremo tubular de las células de aquel segmento revelada por estudios histoquímicos, es un argumento más en favor de dicho concepto.

Aunque no existe acuerdo completo entre los investigadores, debido probablemente a las diferentes condiciones experimentales y metodológicas con que han realizado sus observaciones, se acepta en general que la actividad de fosfatasa alcalina del riñón disminuye manifiestamente en los animales suprarrenalectomizados[21,87,57,44,45,83,84].

Esta disminución es prevenida por la desoxicorticosterona[83,21,57], la lactoflavina[83], siendo ésta más eficaz en este sentido que el extracto cortical, la 11-dehidrocorticosterona o la cortisona[21]. La administración de propionato de testosterona no sólo mantiene sino que aumenta la enzima en el riñón de ratas suprarrenalectomizadas[87].

La hipofisectomía[52] y la tiroidectomía quirúrgica o por administración de substancias antitiroideas producirían como la suprarrenalectomía, una disminución de fosfatasa alcalina. La castración en el macho no aumenta la cantidad total pero aumenta la concentración de fosfatasa alcalina en el riñón de la rata[52]. La administración de testosterona y demás esteroides renotróficos produce disminución de la concentración de fosfatasa alcalina y aumento de la ácida[48].

b) *Glutaminasa* - Es una enzima que hidroliza la glutamina en ácido glutámico y amoníaco e interviene por tanto en los mecanismos de regulación del equilibrio ácido base por el riñón. En la insuficiencia suprarrenal se observa una disminución de la capacidad del riñón por excretar amoníaco. Ello no puede atribuirse a falta de substracto pues el nivel de glutamina en el plasma es normal en los animales suprarrenalectomizados[99]. La glutaminasa renal también se conserva normal en ratas suprarrenoprivas[98]; es posible pues que la menor excreción de NH3 sea debida más bien a una disminución de la capacidad del riñón para excretar ácido que a un defecto en el mecanismo de formación de amoníaco[99].

La administración de tiroxina produce una gran activación (de hasta 200 a 300 %) de la glutaminasa renal[98].

En los animales hipofisoprivos la glutaminasa sería normal para algunos[98,99] y estaría disminuida según otros[45,4].

c) *Arginasa* - La arginasa es una enzima que hidroliza la arginina transformándola en ornitina y urea. La administración de andrógenos (tstosterona, metiltestosterona) produce un gran aumento de la concentración de arginasa en el riñón (Kochakian)[48].

La hipofisectomía[52] y la adrenalectomía[54] producen disminución de la arginasa renal. El estradiol y la cortisona provocan aumentos moderados.

d) *Aminoácido oxidasa* - La castración en el ratón macho produce una disminución del contenido de D-aminooxidasa en el tejido renal, que se corrige dando testosterona[11].

La suprarrenal y la hipófisis pueden también modificar la actividad de aminoácido oxidasa del riñón[43].

e) *Prolina oxidasa* - La suprarrenalectomía produce una disminución de la capacidad del riñón para oxidar la prolina[86] y es restaurada por la administración de cortisona y no por desoxicorticosterona[86].

CONCLUSIONES

En esta revista, necesariamente breve y superficial, hemos tratado de mostrar que el riñón está, como muchos otros órtanos, sujeto a la influencia de las glándulas endocrinas. A pesar de los numerosísimos trabajos dedicados a este tema, aun no puede llegarse a conclusiones definitivas respecto de si la influencia de estas glándulas se ejerce directamente sobre el riñón o si los cambios que es dable observar en su morfología, en sus funciones específicas, en sus modalidades excretoras o en su actividad enzimática son consecuencia directa de las deficiencias o excesos hormonales o son secundarios a cambios metabólicos más generales.

Parece bastante probado que la acción del principio antidiurético de la neurohipófisis y de las hormonas del tipo de mineralocorticoides tienen una acción renal directa. La primera aumentando la capacidad máxima de reabsorción de agua del tubo distal y la segunda aumentando la capacidad máxima de reabsorción de Na del mismo sector. Es probable que también las hormonas tengan una acción directa sobre ciertas enzimas renales.

Las influencias de las glánduls endocrinas sobre el trofismo renal y sus funciones específicas son, a mi juicio, influencais indirectas, consecuencias de las profundas influencias de dichas glándulas sobre el metabolismo. La llamada función renotrófica de la hipófisis, la tiroides y la hormona masculina no puede, según mi manera de ver, equipararse, por ejemplo, a la función adrenocorticotrófica de la hipófisis. Mientras esta última es una acción específica y directa vinculada a una hormona particular, la acción renotrófica de la hipófisis, tiroides o testículo se ejercería a través de las modificaciones del metabolismo proteico inducidas por exceso o defecto de dichas glándulas. Un argumento poderoso en favor de esta hipótesis es de que la administración de dietas ricas en proteínas tienen un efecto renotrófico tan acentuado casi como la administración de hormonas hipofisarias o tiroideas y a la inversa la administración de dietas pobres en proteínas producen una hipotrofia e hipofunción renal similar a la que sucede a la hipofisectomía o tiroidectomía. Estas y otras razones me han llevado a la hipótesis de que la masa renal y sus funciones están reguladas por una substancia hipotética, la renotrofina, cuya concentración sanguínea dependería de la intensidad del metabolismo proteico. La renotrofina (o renotrofinas) podría ser un producto del metabolismo intermedio de las proteínas.

SUMMARY

Different aspects of the relations between endocrine glands and the kidney are revised, among them the renotrophic action of these glands, their influence upon global kidney function, upon water and electrolite excretion and upon kidney metabolism and enzymes.

In spite of the numerous papers written on that subject it has not yet been possible to conclude whether the endocrine glands exercise a direct influence on the kidney or whether the changes that can be detected in its morphology, excretion, and enzymatic activity are a direct consecuence of hormonal excess or defficiences, or secondary to more general metabolic changes.

It has been fairly proved that the antidiuretic principle of posterior pitiuitary and the mineralcorticoid hormones act directly upon the kidney. The former increases the maximal capacity of renal tubules to reabsorb water and the latter increases the maximal ability of sodium reabsorption of the same. It is also probable that hormones act directly upon certain renal enzimes.

The influence of endocrine glands upon the trophism and speciphic functions of the kidney are indirect owing to the profound influences of the pituitary, the thyroid and the sex male hormones in exerted through modifications in protein metabolism due to the either and excess or a defficiency of those hormones. The administration of protein rich diets has a great a renotrophic action as that of pituitary and thyroid hormones and the administration of protein poor diets produces hypotrophy and hypofunction of the kidney similar to those that follow hypophysectomy or thyroidectomy. These and other reasons have led the authors to the hypothesis that the renal mass and functions are controlled by a hypophetic substance –renotrophin– the blood level of which depends on the intensity of protein metabolism. The renotrophin (or renotrophins) might be a product of the intermediate metabolism of proteins.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander, J. D.; Pellegrino, E. D.; Farber, S. J.; Earle, D. P.: *Endocrinology,* 1951, 49, 136.
2. Asling, C. W.; Reinhardt, W. O.; Li, C. H.: *Endocrinology*, 1951, 48, 534.
3. Astabaradi, T. H.; Essex, H. E.: *Amer. J. Physiol*., 1953, 173, 526.
4. Bartlett, P. D.; Gaebler, O. H.: *J. biol. Chem.*, 1949, 181, 523.
5. Bekhum, D. W. van; Kassenar, A. A. H.: *Acta endocrinol.*, 1951, 8 155.
6. Blackman, S. S. Jr.; Thomas, C. B.; Howard, J. E.: *Amer. Heart J*., 1944, 28, 825.
7. Braun-Menéndez, E.: *Rev. Soc. argent. Biol.*, 1946 22, 279.
8. Braun-Menéndez, E.: *Rev. Soc. argent. Biol*., 1950 26, 65.
9. Braun-Menéndez, E.; Houssay, H. E. J.: *Rev. Soc. argent. Biol.*, 1949, 25, 55.
10. Braun-Menéndez, E.; Prado, J. L.: *Rev. Soc. argent. Biol.*, 1950, 26, 188.
11. Clark, L. C.; Kochakian, C. D.; Fox, R. P.: *Science,* 1943, 98, 89.
12. Colonge, R.: C. R. *Soc. Biol.*, Paris, 1944, 138, 494.
13. Cottet, J.; Krumm-Heller, C.; de Fombelle, F.: *J. d'Urol*., 1951, 57, 276.
14. Crabtree, C. E.: *Endocrinology,* 1941, 29, 197.
15. Dean, A. L.; Abels, J. C.; Taylor, H. C.: *J. d'urol.*, 1945, 53, 647.
16. Dragoni, G.: *Boll. Soc. ital. Biol., sper.*, 1952, 28, 1499.
17. Dragoni, G.: *Boll. Soc. ital. Biol., sper.*, 1953, 29, 303-303.
18. Earle, D. R. (Jr.); de Bodo, R. C.; Schwartz, I. L.; Farber, S. H.; Kurtz, M.; Greenberg, J.: *Proc. Soc. exper. Biol., N. Y.* 1951, 76, 608.
19. Eiler, J. J.; Althausen, T. L.; Stockholm, M.: *Amer. J. Physiol.*, 1944, 140, 699.
20. Foglia, V. G.; Houssay, H. E.: *Rev. Soc. argent. Biol*., 1942, 18, 376.
21. Folley, S. J.; Greenbaum, A. L.: *Biochem. J*., 1946, 40, 46.
22. Fontaine, T.: *Arch. Sci. Physiol*., 1947, 1, 357; C. R. Soc. Biol., Paris, 1947, 141, 569.
23. Fontaine, T.: *Arch. Sci. Physiol*., 1948, 1, 357.
24. Fontaine, T.: Veil, C.: C. R. Soc. Biol., Paris, 1945, 140, 187.
25. Fontaine, T.: Veil, *C. Arch. Sci. Physiol*., 1947, 1, 49.
26. Gaarenstrom, J. H.: *Acta brev. neerl. Physiol. Pharmacol. Microbiol*., 1942, 12, 107.
27. Gaunt, R.; Birnie, J. H.; Eversole, W. J.: *Physiol. Rev.*, 1948, 29, 281.
28. González, R.: *Rev. Soc. argent. Biol*., 1938, 14, 173.
29. Gross, F.; Meier, R.: *Experientia*, 1951, 7, 74.
30. Hall, C. E.; Hall, O.: Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 1952, 79, 536, 538.
31. Hall, V. E.; Mc, Gregor, W. W.; Anat. Rec., 1937, 69, 319.
32. Halpern, B. N.; Cournot, L.: Arch. Sci. Physiol., 1953, 7, 111.
33. Halpern, B. N.; Cournot, L.: C. *R. Soc. Biol., Paris,* 1952, 146, 64.
34. Halpern, B. N.; Cournot, L.; Camn, J.: C. *R. Soc. Biol., Paris*, 1951, 145, 1080.
35. Handley, C. A.; Moyer, J. h.; Kennedy, O.; Costa, P.: *J. Pharmacol*., 1951, 101, 283.
36. Hare, K.; Phillips, D. M.; Bradshaw, J.; Chambers, G.; Hare, R.: *Amer. J. Physiol*., 1944, 141, 187.
37. Hay, E. C.: *Amer. J. med. Sci.*, 1946, 212, 535.
38. Hay, E. C.: *J. Pharmacol*., 1946, 88, 208.
39. Hay, E.; Seguin, P.; Larrivière, M.; Jensen, H.: *Fed. Proc.*, 1946, 5, 137.
40. Heinbecker, P.; Rolf, D.; White, H. L.: *Amer. J. Physiol.*, 1943, 139, 533.
41. Herlant, M.: *Ann. Endocrinol.*, 1949, 10, 313.
42. Humm, J. H.; Kochakian, C. D.; Bartlett, Mary N.: *Amer. J. Physiol*., 1948, 155, 251.
43. Jensen, H.; Gray, J. L.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1951, 54, 619.
44. Jiménez-Díaz, C.: *Lancet*, 1936, 2, 1135.
45. Jiménez-Díaz, C.; Villasante, J. G.: Picatoste, R.: *Rev. clin. esp*., 1050, 39, 161.
46. Kopp, C.; Young, N. F.: Taylor, H.: *J. clin. Invest.,* 1945, 24, 189.
47. Kochakian, C. D.: Amer. J. Physiol., 1944, 142, 315.
48. Kochakian, C. D.: *Recent. Progr. Hormone Res.*, 1947, 1, 177.
49. Kochakian, C. D.: *Amer. J. Physiol.*, 1949, 158, 51.
50. Kochakian, C. D.: Barlett, M. N.: *Amer. J. Physio*l., 1948, 155, 251.
51. Kochakian, C. D.; Barlett, M. N.; Gongora, J.: *Amer. J. Physiol*., 1948, 153, 210.
52. Kochakian, C. D.; Roberston, E.: *Arch. Biochem*., 1950, 29, 114.
53. Kochakian, C. D.; Stettner, C. E.: *Amer. J. Physiol*., 1948, 155, 255.
54. Kochakian, C. D., Vail, V. N.: *J. biol. Chem*., 1947, 169, 1.
55. Korenchevsky, V.; Dennison, M.; Kohn-Speyer, A.: *Biochem. J*., 1933, 27, 557.
56. Korenchevsky, V.; Ross, M. A.: *Brit. med. J.,* 1940, 1, 645.
57. Kutschler, W.; Wust, H.: Z. *Physiol. Chem.,* 1942, 273, 235.
58. Lattimer, J. K.: *J. Urol.*, 1942, 48, 778.
59. Ludden, J. B.; Krieger, E.; Wright, I. S.: *Endocrinology,* 1941, 28, 619.
60. Mac Kay, E. M.: *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, 1940, 45, 216.
61. Mac Kay, E. M.; Mac Kay, L. L.: *J. Nutrit.*, 1931, 4, 33.
62. Mac Kay, L. L.; Mac Kay, E.: *Amer. J. Phisiol*., 1927, 83, 196.
63. Mac Kay, E. M.; Smith, F. M.; Closs, K.: *J. Nutrit.*, 1933, 6, 151.
64. Mc. Queen-Williams, M.; Thompson, K. W.: *Yale J. Biol. Med.*, 1940, 12, 531.
65. Handel, L.; Jacob, M.; Mandel, P.: *C. R. Soc. Biol., Paris*, 1951, 145, 1231.
66. Maxwell, M.; Reed, E. S.: *J. Pharmacol*., 1951, 103, 190.

67. Pfeiffer, C. A.; Emmel, V. M.; Garner, W. V.: *Yale J. Biol. Med*., 1940, 12, 493.
68. Pickford, M.; Ritchie, A. E.: *J. Physiol*., 1945, 104, 105.
69. Reiss, M.: *Nature*, 1944, 154, 737.
70. Richardson, J. A.; Houck, C. R.: *Amer. J. Physiol*., 1951, 165, 93.
71. Schaffenburg, C. A.; Masson, g. M. C.; Corcoran, A. C.: *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, 1954, 87, 469.
72. Selkurt, E. E.; Talbot, J.; Houck, C. R.: *Amer. J. Physiol*., 1943, 140, 260.
73. Selye, H.: J. *Urol.*, 1939, 42, 637.
74. Selye, H.: *J. Pharm. and Exper. Therap.*, 1049, 68. 454.
75. Selye, H.: *J. Urol*., 1941, 46, 110.
76. Selye, H.: *Canad. med. Ass. J.,* 1944, 50, 426.
77. Selye, H.; Martínez, H.; Thompson, D. L.; Collip, J. B.: *Arch. Path.,* 1934, 18, 878.
78. Selye, H.; Stone, H.: *J. d'Urol*., 1946, 56, 399.
79. Selye, H.; Stone, H.; Nielsen, K.; Leblond, C. P.: *Canad. med. Ass. J*., 1945, 52, 571.
80. Simpson, M. E.; Li, Ch. H.; Evans, H. M.: *Endocrinology*, 1946, 39, 78.
81. Smith, H. W.: Oxford University Press, New York, 1951.
82. Smith, P. E.: *Amer. J. Anat*., 1930, 45, 205.
83. Soulariac, A.: *C. R. Soc. Biol., Paris*, 1948, 142, 778.
84. Soulariac, A.; Desclaux, P.; Teysseyre, T.: C. R. *Soc. Biol., Paris*, 1949, 143, 1595.
85. Swann, H. G.: *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y*., 1939, 40, 520.
86. Umbreit, W. W.; Tonhazy, N. E.: *J. biol. Chem*., 1951, 191, 249.
87. Vail, V. N.; Kochakian, C. D.: *Amer. J. Physiol*., 1947, 150, 580.
88. Van Dyke, H. B.: *Macy Found. Conf.*, 1950, 2, 48.
89. Welsh, C. A.: Rosenthal, A.; Duncan, M. T.; Taylor, H. C.: *Amer. J. Physiol*., 1942, 137, 338.
90. White, H. L.; Heinbecker, P.: *Amer. J. Physiol.,* 1938, 123, 566.
91. White, H. L.; Heinbecker, P.: *Amer. J. Physiol.,* 1940, 130, 464.
92. White, H. L.; Heinbecker, P.; Rolf, D.: *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, 1941, 46, 44.
93. White, H. L.; Heinbecker, P.; Rolf, D.: *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, 1941, 46, 44.
94. White, H. L.; Heinbecker, P.; Rolf, D.: *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y*., 1942, 136, 584.
95. White, H. L.; Heinbecker, P.; Rolf, D.: *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, 1947, 149, 404.
96. White, H. L.; Heinbecker, P.; Rolf, D.: Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 1949, 156, 67.
97. White, H. L.; Heinbecker, P.; Rolf, D.: Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 1949, 157, 47.
98. White, H. L.; Rolf, D.: *Amer. J. Physiol*., 1952, 169, 174.
99. White, H. L.; Rolf, D.: *Amer. J. Physiol*., 1953, 174, 27.
100. Wintermitz, M. C.; Waters, L. L.: *Yale J. Biol. Med*., 1940, 12, 705.
101. Zeckwer, I. T.: Amer. J. Physiol., 1946, 145, 681.

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Copyright ® 2015 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Vol 52 • Nº 3

TRABAJO ORIGINAL

Long-Term Follow Up of Thyrotropinomas: The Role of Radiotherapy and Long-Acting Somatostatin Analogs. Report of Two Cases

Evolución a largo plazo de tirotropinomas: papel de la radioterapia y análogos de somatostatina de acción prolongada. Reporte de dos casos

Insua A, García L

Service of Endocrinology, Department of Internal Medicine, CEMIC (Centro de Educación e Investigaciones Clínicas), Buenos Aires, Argentina

ABSTRACT

Thyrotropinomas or TSHomas are functioning pituitary adenomas that produce central hyperthyroidism and are often detected at macroadenoma stage, with the expected mass effects of large pituitary tumors. We report the long-term outcome of two thyrotropinomas, and discuss the treatment options adopted and available for these patients. Our first patient was seen 4 years after diagnosis of hyperthyroidism and two years after pituitary surgery, with persistent disease. The second subject was diagnosed soon after the detection of a symptomatic pituitary mass with extrasellar extension, with the corresponding clinical and laboratory workup. None of them was cured by surgery alone; both were treated with somatostatin analogs and radiotherapy with a clear improvement of their condition. **Rev Argent Endocrinol Metab 52:120-128, 2015**

No financial conflicts of interest exist.

Key words: Thyrotropinomas. Long-term evolution. Radiotherapy, octeotride

RESUMEN

Los tirotropinomas son raros adenomas hipofisarios funcionantes, que producen hipertiroidismo central y, como se suelen detectar en el estadio de macroadenomas, con los signos de masa correspondientes. Presentamos la evolución a largo plazo de dos tirotropinomas para analizar las opciones terapéuticas adoptadas y disponibles para estos pacientes. Nuestro primer caso fue visto 4 años después del diagnóstico de hipertiroidismo, y dos años pos cirugía pituitaria, con enfermedad persistente. El segundo sujeto fue diagnosticado poco después de la detección de una masa hipofisaria, con expansión extraselar sintomática, mediante la evaluación clínico endocrionológica y de laboratorio pertinente. Ninguno de los dos fue curado por la cirugía solamente; ambos fueron tratados con análogos de somatostatina y radioterapia, con un claro beneficio clínico, imagenológico y bioquímico. **Rev Argent Endocrinol Metab 52:120-128, 2015**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Palabras clave: Tirotropinomas. Evolución alejada; radioterapia; octeotride

INTRODUCTION

Thyrotropinomas or TSHomas, are rare pituitary neoplasms[1], that comprise less than 2 % of all hypophyseal tumors.They are usually detected at the stage of macroadenomas. These pituitary tumors[2] produce central hyperthyroidism and the corresponding local manifestations of the mass.

Recibido: 6-01-2015 Aceptado: 28-05-2015

Correspondencia: Dr. Alvaro Insúa Hospital Universitario CEMIC sede Saavedra, Galván 4202, CABA, Argentina. Tel:541152990100. Email: insuaalvaro@gmail.com

Even nowadays around 30 % of patients are treated previously as if they have had different forms of hyperthyroidism of thyroideal origin[3], which can turn their management difficult and worsen the natural course of the disease.

MATERIAL AND METHODS

The medical records of 2 patients with a diagnosis of thyrotropinoma were exhaustively reviewed with emphasis in clinical presentation, laboratory and imaging results, according to treatments employed at different periods of the evolution. The trend over time in TSH values was analysed by an ANOVA test.

RESULTS

Case 1

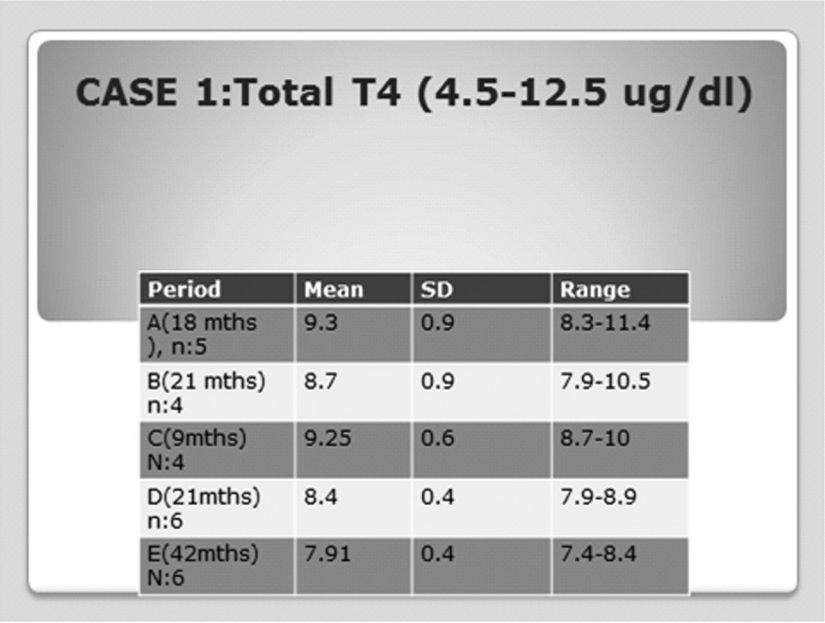
A 73 years old caucasian asymptomatic woman consulted because of a pituitary tumor that had been operated two years before. At age 69 a diagnosis of overt hyperthyroidism was made [T4: 19.5 ug/dl (nv: 4.5-12.5 ug/dl)] with an elevated TSH [5.63 uU/ml (nv: 0.27-4.20 uU/ml)]. Months before, she had had atrial fibrillation, along with a 10 % decrease in body weight, without headaches or ocular complaints. A 5 mCi dose of I^{131} had been given that resulted in hypothyroidism, so she had been placed under levothyroxine (LT4) (100 ug/day). At age 71, because a progressive increase in TSH [maximum: 33.10 uU/ml, (Table 1, period A)], in spite of normal serum T4 (Table 2,A), a pituitary MRI was performed, that depicted a macro adenoma of 2.8 cm height, with upward displacement of the pituitary stalk and chiasm, and bilateral contact with the cavernous sinuses (Figure 1, A). Serum PRL was slightly elevated, IGF1 normal, and serum cortisol decreased. Hydrocortisone (30 mg/day) was added to levothyroxine. A surgical transsphenoidal pituitary approach of the tumor was done, partially resecting an adenoma that stained positive for TSH. The procedure reduced the cephalocaudal length of the tumor to 2,2 cm (Figure 1, B). After surgery, a drop of serum TSH to 4,15 uU/ml was noted, followed by a stepwise increase up to 20.43 uU /ml [(Table 1, period B), with normal T4 (Table 2, B), during the next 20 months. At this moment she was seen by us for the first time. Physical examination showed a kyphotic woman, 1.56 mts height, with a body weight of 64 kg(BMI: 26. 30KG/M2), blood pressure 150/80 mmg/Hg, pulse rate 80 beats/min. Laboratory workup was as follows: T4: 10.7 ug/dl, free T4: 1.25 ng/dl (nv: 0.94-1.7 ng/dl), T3: 63 ng/ml (nv: 79-149) and TSH: 20.43 uU/ml (0.35-4.69). Hypopituitarism was diagnosed because of low levels of IGF1 [50 ng/ml (n:

TABLE 1. Case #1: TSH evolution after 7.9 years of follow up(n being the number of observations during each period) [(ANOVA: F: 8.88; p < 0.0003).
*POST-HOC ANALYSIS: P< 0.05

CASE #1: TSH EVOLUTION OVER TIME

Period (months)	n	TSH (uU/ml; n: 0.35-4.69)	SD	Range
A (21): after RAI	5	22.65*	6.10	17.25-33.10
B (20): post Sx: TSSPA	4	12.09	7.08	4.15-20.43
C (12): SSA	4	14.17	2.69	12.00-17.89
D (24): Radiotherapy add on	6	11.21	2.12	7.80-13.38
E (18): idem D	6	7.93	1.90	5.20-10.96

TABLE 2. Case #1: T4 evolution after 7.9 years of follow up (n being the number of observations during each period)



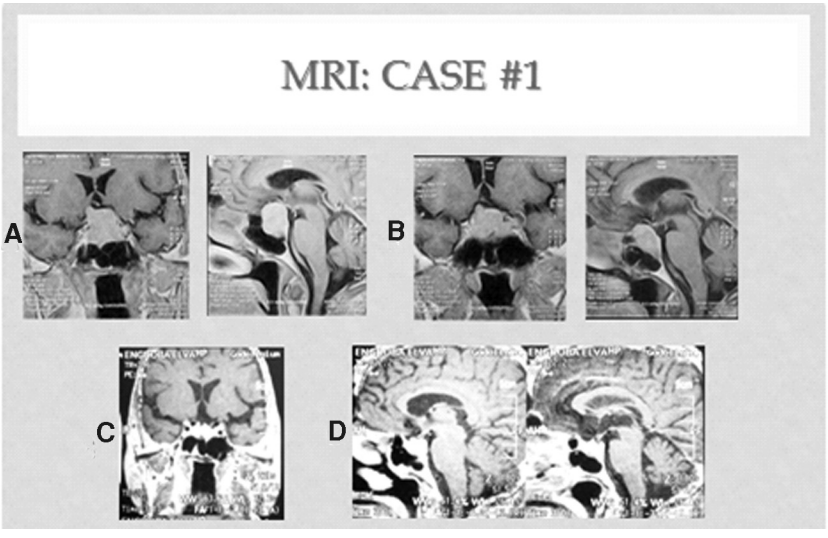


Figure 1. Case #1 A: Left upper panel: before surgery. **B: right upper:** postTSSPA. **C:** left lower panel: 1 y after radiotherapy plus octeotride. **D:** lower right panel; at the end of follow up(3.5 ys after radiotherapy).

70-350]), FSH (2.8 mU/ml) and ACTH (5.8 pg/ml). Alkaline phosphatase was high. The patient was menopaused since age 49 and had experienced a lateral neck fracture at age 66. She was aware of having had a lumbar crush fracture.

Lumbar spine and femur neck BMD were reduced with a - 4.07 and -5.46 TS, respectively. Rx examination of the spine showed the known L1 crush and 2 incident fractures, at T9 and T12 levels. She had established osteoporosis.

A long acting somatostatin analogue (SSA), octeotride, was offered to her and escalated up to 30 mg IM/month. In addition, risedronate 35 mg/week and ergocalcipherol 2400 IU/week were initiated while hydrocortisone was reduced to 20 mg/day, and thyroid hormone switched to a fixe combination

of T3(10 ug/d) and L T4 (90 ug/d). TSH remained elevated (although less fluctuating) [(Table 1, period C), (max v: of 17 uU/ml)] [and Table 2, C), by this approach, without significant changes in tumor size. One year later, radiotherapy of the pituitary was instituted, receiving 50 Gy after threedimentional virtual planning. Octeotride was maintained. During the next 2 years (Table 1, period D) TSH was slightly reduced, with a stable mean T4 (Table 2, D). Three and a half years after radiotherapy plus SSA, the mean TSH value was 7.93 uU/ml, l (Table 1, period E) & (Table 2, E]. The MRIs performed one year and 3.5 years after radiotherapy was given (Figure 1: C&D) showed a progressive decrease in the adenohypophyseal volume, accompanied by an increase in the width between the upper edge of the gland and the chiasm, so at the end of the 8 years of follow up, the height of the pituitary was 1 cm.

Overall, a sustained tendency towards lower TSH levels was obtained by the successive and additive treatments during an almost 8 years of follow up.

A rapid normalization of alkaline phosphatase was noted and bone mineral density (BMD) improved markedly at LS and FN (TS: - 3.3, at both sites), by 2 years after the implemented treatment.

The overall clinical evolution was good, the patient being asymptomatic, with a normalization of body weight and BP and a very good quality of life.

Case 2

A 25 years old man had had recent onset frontal headaches, accompanied by occasional diarrhea, heat intolerance, axilar discomfort, and fatigue. An MRI of the brain detected a pituitary macroadenoma with suprasellar extension and posterior displacement of the optic chiasm (Figure 2, A.)

Computarized visual field assessment was normal.

He was referred for endocrinological evaluation, prior to eventual surgery. At physical examination, he was overweight (BMI: 29,7 kg/m^2), heart rate was 120 beats/min, regular, and blood pressure 140/80 mmHg. Neither goiter nor ocular or skin abnormalities were evident, but bilateral tender gynecomastia was noticed.

Initial laboratory values were as follows: Free T4: 2.48 ng/dl(nv: 0.93-1.7); total T3: 268 (80-200) ng/ml; and TSH: 6.19 uU/ml (nv: 0.27-4.2 uU/7ml). Prolactin: 43.2 ng/ml (2-15), LH 1.5 mU/ml (nv: 2-9 mU/ml), Total To: 0.35 ng/ml (nv: 2.8-9) and Alkaline phospahtase (AP): 383 UI (nv: up to 280 IU). Basal and (ACTH) stimulated cortisol, ACTH, GH and FSH were within normal values.

Ten months earlier laboratory analysis had been performed, showing an increased TSH (5.18 uU/ml; nv: 0.27-4.2). Alkaline phoshatase was also high. However, no further tests had been ordered at that time by the interviening physician.

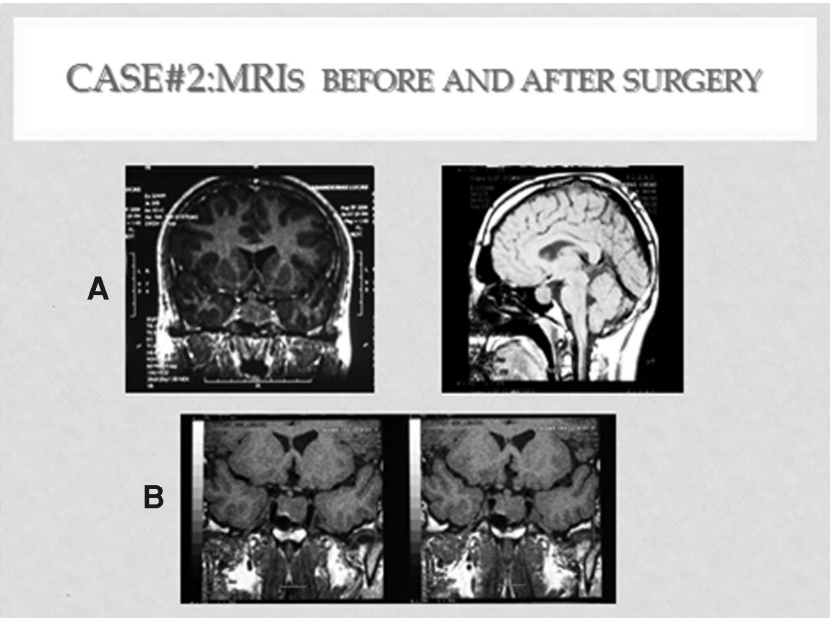


Figure 2. MRIs case #2. A: upper panel: before surgery. **B:** after TSSPA

Since measurement of alpha subunit was not available, a TRH-TSH test was done. Basal TSH was 6.75 uU/ml and stimulated: 6.86. A diagnosis of TSH secreting pituitary adenoma was made, without concomitant secretion of GH, ACTH or gonadotrophins, accompanied with hypogonadotrophic hypogonadism and hyperprolactinemia, either secondary to stalk distortion or cosecretion by the tumor.

Prior to transsphenoidal pituitary microsurgery, the SSA octeotride was prescribed at an initial dose of 20 mg IM, followed by a second 30 mg dose, a month later. Clinical resolution of the thyrotoxicosis was obtained, with FT4 of 1.13 ng/dl, total T3 of 127 ng/ml, and TSH of 1.39 uU/ml.

An uneventual transsphenoidal surgical procedure was done, partially removing fragments of a pituitary chromophobe adenoma, with negative immnunostainning for TSH, FSH, LH, GH, ACTH and PRL. Ki 67 was < 1 %. A month later TSH was 0.87 uU/ml, PRL 22 ng/ml, ACTH stimulated cortisol was also normal, as well as T4 and T3. Cabergoline was initiated at 0.25 mg per week, with normalization of serum PRL and amelioration of gynecomastia. SSA therapy was not reinstituted.

Post surgery MRI showed a decompression of the chiasm along with central reduction of the adenoma, but significant tumor remnants with lateral contact with the cavernous sinuses, were also apparent (Figure 2,B).

Bone mineral density revealed osteopenia at femoral neck (TS: -1,9) and lumbar spine (TS:-1,4). Testosterone replacement normalized alkaline phosphatase and gynecomastia was resolved.

Mean TSH during the first year post surgery was 1.77 uU/ml (n: 4) (Table 3, B) and FT4 was 1.54 ng/dl (n:4), (Table 4, B) with 2 values slightly above the upper limit of normality. MRI did not change further.

A decision was made, taking into account patient preferences, to perform pituitary radiotherapy, preceded by three-dimentional conformational planning. A total dose of 43 Gy was delivered, one and half years after surgery. During the following two years mean TSH was 3.1 uU/ml (n: 9,) (Table 3,C) and FT4 1.68 ng/ml (n: 7), with 4 out of 7 values above the upper limit of normality (1.7 ng/dl.) (Table 4,C). Basal and stimulated cortisol values were still normal and PRL was 1.1 ng/ml under cabergoline treatment.

Two years after radiotherapy, MRI depicted a superior and central cystic area with significant reduction in overall tumor volume. This was accentuated with time, showing a partial secondary empty sella appearance. At that time, and as a consequence of a trend towards central hyperthyroidism, the SSA was reinstituted (30 mg every 45 days). TSH was normalized: 1.15 uU/ml (n:4), but subclinical central *hypothyroidism* resulted. The octeotride

TABLE 3. Case #2. Mean TSH trend over time. A: Before treatment. **B:** After surgery. **C:** post radiotherapy. **D:** SSA add on Tx. **E:** without medical tratment. ANOVA: **F:** 21.75; p < 0.0000).(post -hoc test: p < 0.03)

CASE #2MEAN TSH VALUES

Period (months)	n	TSH (X)(uU/ml; nv: 0.27 4.2)	SD	Range
A (6)	4	6.5*	1.13	5.18-7.89
B (8)	4	1.77	0.92	0.87-3.05
C (24)	9	3.27**	0.92	1.78-4.59
D (65)	16	1.24	0.67	0.11-2.33
E (9)	1	1.12		

dose was reduced progressively to 20 mg every 60 days. Although TSH remained normal, central hypothyroidism persisted, so levothyroxine was added with normalization of LT4, Finally, both drugs were interrupted. The duration of SSA treatment lasted 5 years and 5 months, during which mean TSH was: 1.24 uU/ml (Table 3,D), and FT4 was 0.98 ng/dl (Table 4,D). Nine months after treatment arrestment, TSH was 1.12 uU7ml and FT4 1.10 ng/dl. (Table 4,E). MRIs of the pituitary showed a progressive increase in the central cystic area of the adenohypophysis, so that at the 8 th year of follow up, a partial empty sella turcica developed, thus revealing an important reduction in the overall volume of the adenoma, without appreciable long term sequelae of radiotherapy. (Figure 3).

TABLE 4. Case #2. Free T4 trendover time. Anova F: 8.94,p<0.0001

CASE 2:FT4(0.93-1.7ng/dl)

Period	FT4	SD	Treatment
A(6mths) n:2	2.21	0.38	Before
B(6mths) n:4	1.54	0.33	Post-surgery
C (24 mths) N:9	1.68	0.20	Post radiotherapy
D(65mths) N:16	0.98	0.30	SSA add on
E(9mths) N:1	1.1	_	None

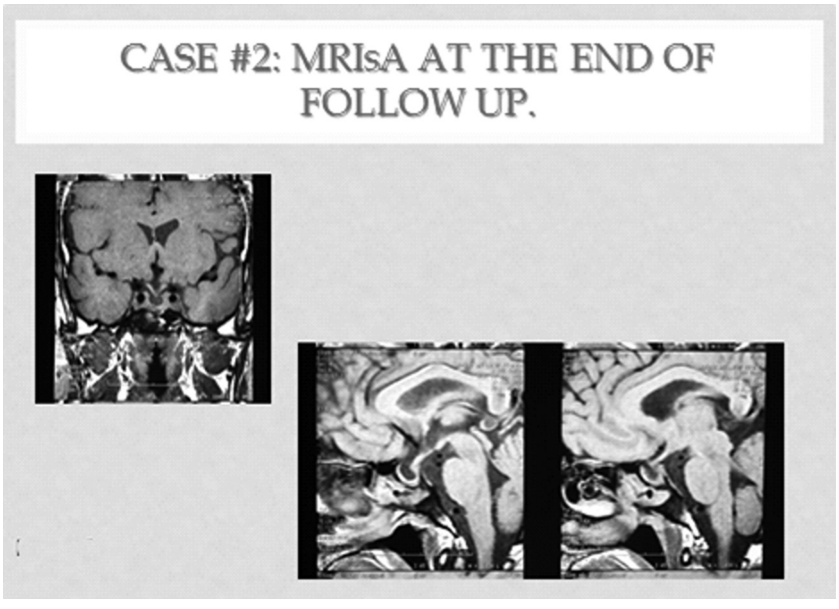


Figure 3: MRIs case #2: at the end of the observation period: 9.1 ys.

During time, laparoscopic cholecystectomy was performed, secondary adrenal failure appeared, IGF 1 still remained normal and femoral neck and lumbar spine BMD were normalized (TS: -0.6 and 0.2, respectively).

DISCUSSION

Thyrotropinomas are frecuently located centrally within the adenohypophyisis. They are usually sporadic and fibrous, probably[4] as a consequence of basic fibroblast growth factor(FGF) expression. The pathophysiology of TSHomas is unknown; however overexpression of Pit-1 factor[5], perhaps in combination with mutations of[6], may contribute to their development. A very recent series[7] of 5 patients, was published in Argentina. Most of them were followed for less than five years, with the exception of 1 subject with an observation period of 8 years. Unfortunately, the patient with the worse prognosis was lost from follow up soon after diagnosis. Nonetheless, 3 patients, with tumor´s diameter ≤ 3.0 cm were cured. No subject had been previously treated with either thyroidectomy or I^{131}.

Thus we have presented two cases followed for 8 and 9 years, respectively, aming to contribute to the regional experience with these rare pituitary tumors.

Our first case is representative of those patients in whom a misdiagnosis of primary hyperthyroidism (probably Graves´ disease) resulted in radioiodine treatment followed by post dose hypothyroidism, two years before surgery. Her hyperthyroidism was moderate to severe and evidence of ACTH deficiency was already evident previous to TSSPA, attributable to the mass effect of a large macroadenoma with supraselar extension. In the Belgium-French series published by Socin et al[8], 13 out of 43 patients (30 %) had received a treatment targeted to the thyroid before pituitary surgery. Patients previously treated with radioiodine or thyroidectomy, are detected with greater delay from de initial symptoms of hyperthyroidism[2,9], present more frequently macroadenomas with compression signs, higher TSH levels, and experience a worse prognosis[8], most probably as a consequence of insufficient negative feedback of thyroid hormones with de tumor[6] allowing it to grow further during longer periods of time ;however, this conclusion[8], is not proven. Our first case suggests that this might be correct, as it happens in Nelson´s syndrome. Socin[8] et al did not find greater tumor volumes in patients that had been previously treated with thyroidectomy or I131. However, adenomas´ diameter[8] was higher in patients treated with TT or RAI than in those that received methimazole. After Drucker Davis et al[9], severity of hyperthyroidism, duration of symptoms and tumor size and invasiveness were the main prognostic factors.

The suspicion of a TSHoma is likely[9] in a patient with thyrotoxicosis, elevated free T4 and T3, without biochemical confounders, in whom sensitive TSH is slightly elevated or even inappropiately normal, distinguishing him from primary hyperthyroidism. TSH[2,6,7,9] is frequently between 4 and 14 μU/ml. The biochemical gold standard for diagnosis[8] is still the measurement of α subunit in the appropriate context, which is overexpressed in TSHomas, resulting in an absolute increase with an elevated molar ratio of α subunit/TSH. The most important distinction is between tumoral and non tumoral inappropriate TSH secretion[10] namely thyroid hormone resistance syndromes (THR). We could not measure α subunit in neither patient, but in case #2 we were able to demonstrate the lack of response to TRH, that can differentiate TSHomas from the normal response seen in THR[10]. In 3 out of 5 patients reported in Argentina[7] TRH-TSH test was also flat. Our two patients had either osteoporosis (case 1) or osteopenia (case 2). In addition, both had high alkaline phosphatase.The two cases were hypogonadal, as the female patient was menopaused, and the male one had secondary hypogonadism from the diagnosis. It should be stressed that the combination of thyrotoxicosis with hypogonadism is particularly dangerous for the skeleton. We thus suggest that bone status and/or remodeling needs to be evaluated in patients with TSHomas, especially when there is a compromise in the gonadal axis.

As with other functional pituitary adenoma[1,8,9,11], with the exception of prolactinomas, surgery is the treatment of choice. In thyrotropinomas[8,11,12] its effectiveness is inversely related with tumor size, success being greater in microadenomas. The overall success rate seems to be around 60 %. It is generally accepted that cure should include a persistent normalization of the thyroid axis dynamics, as well as the absence of residual tumor demonstrated by MRI .Our two patients had residual disease after surgery, so they were not

cured by the procedure. Nonetheless, a decompression of the optic chiasm was achieved, along with a temporal but significant reduction in TSH. In accordance with patients' preferences, we did not re-operate them. Radiotherapy, which is a second line treatment, was offered instead. Prevention of tumor growth and its consequences was the therapeutic priority in both. In case 2, although he could have been further treated by medical means, the patient' s fear of tumor expansion contributed to our decision of irradiating the adenoma relatively early in the curse of the disease. This procedure was well tolerated, without side effects and, in the long run, helped both of them to control their condition. In addition, a reduction in tumor volume was evident in both cases. Moreover, although not cured, our 2nd patient finally achieved a remission of his hyperthyroidism and tumor growth, the latter most probably as a consequence of radiotherapy without ancillary medical treatment. And our first patient remained euthyroid, albeit substituted, as a result of radiotherapy plus medical treatment, with a clear reduction of her tumor volume. TSHomas usually express somatostatin receptors. Accordingly[8,13], somatostatin analogs have been used for the treatment of TS Homas. As we did with our second patient, they are primarily indicated for the preoperative treatment of hyperthyroidism. Thyonamides are only a second option for the preoperative medical treatment of hyperthyroidism. SSA can be employed as second, or third line treatment alternatives. They were assayed in our first patient, when first seen, after faillure of surgery to remove the adenoma and uncontrolled TSH values. Octeotride alone was unable to reduce tumor size, but there was an amelioration of the visual field. TSH was slightly diminished, although not normalized. Consequently radiotherapy was implemented. The combination of both permitted a better control of hypersecretion of TSH, but the shrinkage of the tumor seems to be primarily a result of radiotherapy. Our male patient responded very well to octreotide for the treatment of hyperthyroidism. The drug could have been employed as a second line option, after the faillure of surgery as a curative treatment. As aforementioned, patient´s preferences prompted us to irradiate the macroadenoma instead. It was only after the reappearance of subclinical central hyperthyroidism that octeotride was reinstituted, with an excellent although excessive response that allowed us to stopped it. Development of central hypothyroidism[14] in a girl with a thyrotropinoma treated with a SSA alone, has already been reported.

CONCLUSIONS

We repport the long term evolution of two patients with thyrotropinomas after failure of transsphenoidal pituitary surgery to resolve their condition. Our first case is representative of a linical situation that should no longer be seen: a misdiagnosis of primary hyperthyroidism in the context of inappriopiate secretion of TSH. Her disease could be managed with a combination of radiotherapy plus octreotide. Our second subject was treated from diagnosis with an effective combination of a SSA, prior to surgery, plus the subsecuent addition of radiotherapy.

We thank Dr Alejo Florin Christensen for his kind revision of the manuscript.

REFERENCES

1. **Oruckaptan HH, Sanmevsin O, Ozcan OE, Ozgen T. Gesundheit N, Petrick PA, Nissim M, Dahlberg PA, Doppman JL, Emerson CH, Braverman LE, Oldfield EH, Weintraub BD** Pituitary adenomas: results of 684 surgically treated patients and review of literature. Surg Neurol, 53:211-219, 2000
2. **Gesundheit N, Petrick PA, Nissim M, Dahlberg PA, Doppman JL, Emerson CH, Braverman LE, Oldfield EH, Weintraub BD.** Thyrotropin-secreting pituitary adenomas: clinical and biochemical heterogeneity. Case reports and follow-up of nine patients. Ann Intern Med. Nov 15,111(10):827-3, 1989
3. **Kienitz T, Quinkler M, Strasburger CJ, Ventz M.** Long-term management in five cases of TSH-secreting pituitary adenomas: a single center study and review of the literature. Eur J Endocrinol, Jul157(1):39-46, 2007
4. **Ezzat S, Horvath E, Kovacs K, Smyth HS, Singer W, Asa.** Basic fibroblast growth factor expression by two prolactin and thyrotropin-producing pituitary adenomas. Endocr Pathol,6:125-3,1995
5. **Poncin J, Stevenaert A, Beckers.** Somatic MEN-1gene mutation does not contribute significantly to sporadic pituitary tumorigenesis. Eur J Endocrinol,140:576-576, 1999
6. **Ando S, Sarlis NJ, Oldfield EH, Yen PM** Somatic mutation of TRbeta can cause a defect in negative regulation of TSH in a TSH-secreting pituitary tumor J Clin Endocrinol Metab, 86:5572-6, 2001
7. **Pignatta A,Danilowicz K, Manavela M,Loto M, Gonzalez Abbati S, Toloza C,Fazio L.**

Adenoma hipofisario productor de TSH (tirotropinoma): presentación de cinco casos**.** Rev Argent Endocrinol Metab, 51: 141-150, 2014

8. **Socin HV, Chanson P, Delemer B, Tabarin A, Rohmer V, Mockel J, Stevenaert A, Beckers A.** The changing spectrum of TSH-secreting pituitary adenomas: diagnosis and management in 43 patients. Eur J Endocrinol, 148: 433-42, 2003
9. **Drucker Davis F,Olfield E,Skarulis M,Doppmann JL, WeintraUB BD**.Thyrotropin-secreting pituitary tumors: diagnostic criteria, thyroid hormone sensitivity, and treatment outcome in 25 patients followed at the National Institutes of Health**.** J Clin Endocrinol Metabol, 84(2):476-486, 1999
10. **Mahler GA, Bergoglio LM.** Inappropiate Secretion of TSH syndrome. Rev Argent Endocrinol Metab ;5: 253-264, 2013
11. **Beck-PeccozP, Persani L,** Thyrotropinomas, Endocrinol Met Clin N Am 37: 773-779, 2008
12. **Losa M, Giovanelli M, Persani L, Mortini P, Faglia G, Beck-Peccoz P**. Criteria of crure and follow up of central hyperthyroidism due to thyrotropin secreting pituitary adenomas. J Clin Endocrin Metabol; 81: 3084-90, 1996
13. **KhunJM, Arlot S, Lfebvre H, Caron P, Corlet-Rudelli C,Archabaud F.** Evaluation of the treatment of thyrotropin- secreting pituitary adenomas with a slow release formulation of somatostatin lanreotide.J Clin Endocr Metabol, 85:1487-91, 2000
14. **Rabbiosi S, Peroni E, Tronconi GM, Chiumello G, Losa M, Weber G**. Thyrotropin –secreting pituitary macroadenoma in a 13 years old girl: successfull first line treatment with a somatostatin analog. Thyroid, Oct22(10):1076-1079, 2012

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Copyright ® 2015 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Vol 52 • Nº 3

TRABAJO ORIGINAL

Características clínicas, histopatológicas y factores pronósticos del microcarcinoma tiroideo: estudio retrospectivo multicéntrico

Clinical, Hystopathologic Caractheristics and Prognostic Factors of Thyroid Microcarcinoma: A Retrospective Multicenter Study

Orlandi AM, Gauna A**, Frascaroli G*, Russo Picasso F***, Castro Jozami L#, Martínez MP##*

**Hospital T. Álvarez, **Hospital Ramos Mejía, ***Hospital Italiano, #Hospital Británico, ##Hospital Alemán y Miembros del Departamento de Tiroides de la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo: Abalovich M, Alcaraz G, Brenta G, Cabezón C, Calabrese MC, Califano I, Cavallo A, Corino M, Deutsch S, Faure E, Fassi J, Gutiérrez S, Illera V , Iorcansky S, Jaeger M, Kiejzik M, Lowenstein A, Pitoia F, Puscar A, Sartorio G, Schnitman M, Sklate R, Silva Croome M, Storani ME, Vázquez A, Zunino A*

RESUMEN

Introducción: El microcarcinoma diferenciado de tiroides (MCDT) es definido por la OMS, como un tumor ≤10 mm en su diámetro mayor. Estos tumores son casi exclusivamente de estirpe papilar, representando el 30 % de todos los carcinomas papilares. La historia natural del MCDT es poco conocida y existe una controversia sobre cuál es la óptima forma de abordaje.
Objetivos: 1) Analizar retrospectivamente las características del MCDT; 2) Evaluar factores de riesgo de persistencia/recurrencia en una cohorte retrospectiva seguida en la C.A.B.A.
Materiales y Métodos: Se recolectaron los datos de 187 pacientes en un estudio retrospectivo multicéntrico y se analizaron las características clínicas, histopatológicas, bioquímicas y distintos factores pronósticos del MCDT.
Resultados: El 82,8 % eran mujeres, con una X ± DS de edad de 48 ± 13 años. La mediana de tiempo de seguimiento fue de 38 meses (r: 1-120). El 97 % de los tumores eran de estirpe papilar. En el 29,4 % de los pacientes el hallazgo fue incidental, de los cuales el 57 % se operó por el tamaño del bocio. El 81 % de los pacientes fue sometido a una tiroidectomía total, mientras que el 91,4 % recibió ablación posquirúrgica con radioiodo. Los 174 pacientes que fueron seguidos por más de 12 meses, con una X ± DS de 49 ± 36,9 meses, fueron incluidos en el análisis de sobrevida. El 84 % estaban libres de enfermedad (LE) al final del seguimiento. De los factores de persistencia/recurrencia analizados, la Tg preablativa > 20 ng/ml resultó un predictor independiente. Al realizar el análisis de regresión de Cox para el evento LE, se demostró que tanto la edad <de 45 años, el tamaño tumoral >a 0,5 cm y la Tg preablativa > a 20 ng/ml se relacionaron significativamente con un mayor tiempo para alcanzar un estado LE (p= 0,010, 0,017 y 0,011 respectivamente).
Conclusión: El 84 % de los pacientes se encontró libre de enfermedad al final del seguimiento, avalando el buen pronóstico de esta patología. La edad <de 45 años, el tamaño tumoral > a 0,5 cm y la Tg preablativa > a 20 ng/ml se relacionaron con un mayor tiempo para alcanzar un estado LE. **Rev Argent Endocrinol Metab 52:129-136, 2015**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Palabras clave: Microcarcinoma diferenciado de tiroides, características clínicas, factores pronósticos, cohorte retrospectiva, estudio multicéntrico

Recibido: 20-04-2015 Aceptado: 22-04-2015

Correspondencia: Ana María Orlandi - Mario Bravo 1183 8° A (CP1175) - Tel 15-4147-1402 - Email: amorlandi68@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Differentiated thyroid microcarcinoma (MCDT) has been defined as a differentiated thyroid cancer measuring 10 mm or less. The majority of these tumors are papillary thyroid carcinomas and comprise 30 % of all papillary thyroid carcinomas. Little is known of its natural history and there is an ongoing controversy in the field regarding its optimum management.

Objectives: 1) To describe the characteristics of MCDT 2) To assess risk factors for persistence and/ or recurrence of disease in a retrospective cohort of patients followed up at several health centers of the City of Buenos Aires (CABA).

Patients and Methods: The medical records of 187 patients with MCDT operated on between January 1st , 2000 and December 31st, 2009 at several centers of CABA were retrospectively reviewed, and clinical, histopathological, biochemical characteristics and risk factors were assessed.

Results: Most of the patients were female (82.8 %) and their mean age was 48 ± 13 (X ± SD) years. Median follow up was 38 months (range: 1 to 120 months), and 97 % of tumors were papillary thyroid cancers. Incidentalomas accounted for 29.4 % of tumors, mostly found during a surgical procedure undergone for the size of the goitre. Over 81 % of patients underwent a total thyroidectomy, while 91.4 % received radioactive iodine ablation. Patients with a follow-up longer than 12 months after surgery were analyzed longitudinally to assess prognostic factors of disease outcome (174 patients). After a mean follow-up of 49 ± 36.9 months, 146 (84 %) patients had no evidence of disease. Only postoperative, preablation Tg levels > 20 ng/ml were identified as an independent adverse prognostic factor in the multivariate analyses. In addition, age < 45 ys. ($p< 0.01$), tumor size > 0.5cm ($p<0.017$), and preablation Tg levels >20 ng/ml ($p<0.011$) were independent prognostic factors of a longer time to disease remission in the longitudinal analyses.

Conclusion: Differentiated thyroid microcarcinoma has an excellent prognosis in our local practice, with 84 % disease remission at long-term follow-up. Age at diagnosis, tumor size and preablation Tg levels were independent prognostic factors of time to disease remission. **Rev Argent Endocrinol Metab 52:129-136, 2015**

No financial conflicts of interest exist.

Key words: Differentiated thyroid microcarcinoma, clinical characteristics, prognostic factors, retrospective cohort, multicenter study

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha demostrado un incremento de la incidencia de los carcinomas papilares de tiroides de menos de 2 cm[1-3], probablemente debido a la mejor eficacia diagnóstica y al aumento de la pesquisa de patología tiroidea en la población general. Dado que la tasa de mortalidad no ha aumentado en forma proporcional, se plantea la utilización de herramientas diagnósticas, terapéuticas y de seguimiento menos agresivas y costosas, pero que sean más acordes al excelente pronóstico de estos tumores.

El microcarcinoma diferenciado de tiroides (MCDT) es definido por la OMS, como un tumor ≤ 10 mm en su diámetro mayor. Estos tumores son casi exclusivamente de estirpe papilar, representando aproximadamente el 30 % de todos los carcinomas papilares. En la mayoría de los casos su diagnóstico es incidental. El hallazgo de MCDT en material histopatológico de piezas quirúrgicas procedentes de patología tiroidea benigna, representa aproximadamente el 30 %. Su asociación más frecuente es referida con el bocio multinodular, seguido por el adenoma folicular, y menos frecuentemente, con la tiroiditis crónica y la hiperplasia nodular. Por otra parte, su prevalencia en piezas de autopsias varía entre 3-40 % según datos provenientes de diferentes países[4,5].

La historia natural del MCDT es poco conocida. Si bien la mayoría de estos tumores se caracteriza por un comportamiento biológico poco agresivo con excelente pronóstico, también han sido descriptos casos con compromiso metastásico a distancia y óbito. Dicha variabilidad en la evolución genera controversias en cuanto al abordaje terapéutico. La conducta habitual de tiroidectomía total seguida de radioiodo con el fin de reducir la posible recurrencia o persistencia de la enfermedad, contrasta con las actuales recomendaciones de procedimientos menos invasivos[6,7]. Por tal motivo, diferentes estudios han tratado de identificar aquellos factores que podrían predecir su comportamiento. El hallazgo incidental de MCDT en patología benigna, la presencia unilateral y la unifocalidad, indicarían un excelente pronóstico Contrariamente, la invasión capsular y/o vascular, la presencia de adenopatías y/o metástasis (MTS) a distancia,

reflejarían una mayor agresividad, con un mayor riesgo de recidiva o persistencia de enfermedad, justificando por lo tanto, una mayor rigurosidad en el tratamiento y seguimiento[8].

Por tal motivo, nos propusimos: 1) Analizar retrospectivamente las características del MCDT en nuestro medio; 2) Evaluar factores de riesgo de persistencia/recurrencia en esta población.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron los datos de 187 pacientes en un estudio retrospectivo multicéntrico de 10 centros de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires entre los que se encontraban: Hospital Alemán, Hospital Álvarez, Hospital de Clínicas José de San Martín, Hospital Churruca, Hospital Fernández, Hospital Italiano de Buenos Aires, Hospital Dr. C. Milstein, Hospital Ramos Mejía, Instituto de Oncología A. H. Roffo y Hospital Tornú.

Se incluyeron pacientes mayores de 18 años con diagnóstico histológico de MCDT en un periodo comprendido entre el 1° de enero de 2000 y el 31 de diciembre de 2009 inclusive. Se excluyeron los pacientes con diagnóstico de carcinoma medular, linfoma, carcinoma indiferenciado y MTS de otros carcinomas en la glándula tiroides.

Se analizaron los siguientes datos: edad, sexo, forma de presentación del tumor (incidental o diagnóstico prequirúrgico), tamaño tumoral, variante histológica, multifocalidad, extensión de la cirugía, vaciamiento ganglionar, presencia al momento del diagnóstico de MTS locorregionales y/o a distancia, tiroglobulina (Tg) preablativa y dosis ablativa / terapéutica de radioiodo.

Para el análisis de la evaluación a tiempo final se consideró el tiempo de seguimiento en meses y el estado final de enfermedad [libre de enfermedad (LE) o con enfermedad persistente/recurrente (PE)]. En los pacientes radioablacionados se consideró LE a tiempo final cuando la Tg bajo TSH estimulada era < 2 ng/ml con anticuerpos antitiroglobulina ultrasensibles (aTg US) negativos, con centellograma diagnóstico con Iodo^{131} (I^{131}) y ecografía de cuello negativos. En los pacientes no radioablacionados se consideró LE a tiempo final cuando la Tg bajo inhibición era < 1 ng/ml, con aTg US negativos y ecografía de cuello negativa. Se consideró PE cuando cualquiera de los métodos de imágenes era positivo y/o cuando la Tg bajo inhibición era > 1 ng/ml.

Análisis estadístico:
Los datos fueron resumidos mediante estadística descriptiva (media ± desvío estándar, o mediana y rangos para variables cuantitativas, y frecuencias para nominales). Las comparaciones de variables entre grupos fueron analizadas con la prueba de t de Student, de χ^2 o la prueba exacta de Fisher. El análisis de los factores pronósticos asociados a un estado LE al final del seguimiento fueron realizados con una prueba de regresión logística multivariada.

Se construyeron curvas de sobrevida para el evento "libre de enfermedad" por el método de Kaplan Meier, para lo cual se excluyeron pacientes sin datos de seguimiento postoperatorio (n=13). La correlación del tiempo transcurrido hasta el estado LE entre los diferentes subgrupos se realizó mediante el Log-rank test. Se realizó un análisis multivariado en un modelo de regresión de Cox, considerando el tiempo transcurrido al estado LE como variable dependiente.

Se consideró $p < 0,05$ como un valor significativo. Para el procesamiento se utilizó STATA 9.1 StataCorp Texas, USA.

RESULTADOS

• Características del MCDT en nuestro medio:
Se estudiaron 187 pacientes, 155 mujeres (82,8 %), con una X ± DS de edad de 48 ± 13 años (r: 20-87). En la Tabla I se resumen las características de la población. La mediana de tiempo de seguimiento de la población incluida en el análisis descriptivo fue de 38 meses (r: 1-120).

En los MCDT de diagnóstico incidental (n=55), los motivos que llevaron a los pacientes a la cirugía fueron: tamaño (57 %), Punción Aspiración con Aguja Fina no diagnóstica (17 %), cirugía no tiroidea (16 %), síntomas compresivos (7 %) y motivos estéticos o deseo del paciente (3 %).

En los MCDT no incidentales, se llegó al diagnóstico por un nódulo palpable en 56 pacientes (44,4 %), por un nódulo ecográfico en 55 (43,7 %), adenopatías en 12 (9,5 %) y MTS a distancia en 1 (0,8 %).

Se registraron complicaciones posquirúrgicas en 49/183 (26,8 %); entre ellas se incluyen 4 casos de hipoparatiroidismo definitivo y 1 de parálisis recurrencial.

Las variantes histológicas del carcinoma papilar halladas fueron: clásico 79,6 %, folicular 8,3 %, esclerosante 6,6 %, células altas 3,3 % y oncocítico 2,2 %.

TABLA I. Características clínicas, bioquímicas y anatomopatológicas de los pacientes con MCDT

	n/total (%)
Antecedentes familiares de carcinoma diferenciado de tiroides	15/107 (8)
Pacientes Eutiroideos	108/130 (83)
TSH (X ± DS mU/L)	1,91 ± 1,71
Anticuerpos TPO +	22/67 (32)
Anticuerpos Tg +	9/38 (23,6)
Incidentales	55/187 (29.4)
Tamaño (X± DS mm)	6,5 ± 2,5
Histología Papilares/Foliculares	181/6 (97/3)
Multifocalidad	45/187 (25,7)
Bilateralidad	30/187 (16)
Invasión capsular	26/187 (13,9)
N1	29/187 (15)
M1	1/187 (0,54)
Tiroidectomía total	151/187 (81)
Tiroidectomía subtotal/otros	36/187 (19)
Vaciamiento ganglionar	48 /174 (26,9)
Dosis ablativa	171/187 (91,4)
Tratamiento supresivo	169/187 (91,8)
Tg preablación ≤ 20 ng/ml	136/148 (91,4)
Pacientes libres de enfermedad al final del seguimiento	146/187 (84)

La distribución de los valores de Tg preablativa se muestran en la Tabla II.

De los 171 pacientes que recibieron una dosis ablativa con radioiodo, 131 (76,6 %) recibieron una dosis única. La dosis acumulada de I^{131} al final del seguimiento en el 60 % de los pacientes fue de 100 mCi. Veinticinco por ciento recibieron 101-200 mCi, 11 % de 201-500 mCi, y 2 % de 501-1000 mCi. El 1 % recibió < 100 mCi.

Luego de la cirugía, 174 pacientes fueron seguidos por más de 12 meses, con una X ± DS de 49 ± 36,9 meses y una mediana de 47 meses (r: 12 a 120).

Al final del seguimiento, 146/174 (84 %) estaban LE, mientras que 28/174 (16 %) presentaban PE.

● Factores de riesgo de persistencia/recurrencia del MCDT en nuestra población:

El análisis bivariado comparó las características de los pacientes LE vs. PE en relación a diversos factores pronósticos. Solo se encontraron diferencias significativas en la edad, el hallazgo incidental, MTS al diagnóstico, la Tg preablativa y el tiempo de seguimiento de los pacientes. La presentación incidental de la enfermedad se asoció significativamente a un estado LE. (Tabla III).

TABLA II. Valores de Tg preablativa (148/187)

	n (%)
< 2 ng/mL	82 (55 %)
2,1-10 ng/mL	45 (30,4 %)
10,1-20 ng/mL	9 (6 %)
> 20 ng/mL	12 (8,6 %)

De todos estos factores solamente la Tg preablativa > 20 ng/ml resultó un predictor independiente de PE en el análisis de regresión logística (Tabla IV).

Al realizar el análisis de regresión de Cox para el evento LE, se demostró que tanto la edad < de 45 años, el tamaño tumoral >a 0,5 cm y la Tg preablativa > a 20 ng/ml se relacionaron significativamente con un mayor tiempo para alcanzar un estado LE (p= 0,010, 0,017 y 0,011 respectivamente), como se puede observar en los gráficos 1, 2 y 3.

Dada la diferente evolución observada en los pacientes < de 45 años, se analizaron sus características diferenciales (Tabla V). Solo la presentación incidental fue significativamente menos frecuente en este grupo etario.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha evidenciado un aumento de la incidencia del cáncer diferenciado de tiroides[9], principalmente a expensas de tumores de menos de 1 cm, en los cuales no se ha visto afectada la mortalidad[10,11]. Esto plantea la necesidad de optimizar el uso de recursos diagnósticos y terapéuticos según el pronóstico de estos tumores.

Este trabajo analiza retrospectivamente las características clínicas y la evolución de una cohorte multicéntrica de pacientes con diagnóstico histológico de MCDT, seguidos en varios centros asistenciales de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

De las características clínicas y de presentación analizadas en esta serie, la presencia de MTS ganglionares (15 %), resultó ser más baja que la comunicada por otros autores. Experiencias nacionales[12] e internacionales[13,14,15] han comunicado MTS ganglionares entre 24 y 43 %. Esta diferencia podría reflejar distintas actitudes frente a la disección ganglionar profiláctica entre dichos centros. En nuestra serie, el 38,5 % de los pacientes fueron sometidos a una disección ganglionar, mientras

TABLA III. Características de pacientes con enfermedad persistente/ recurrente vs. Libres de enfermedad

	Libre de enfermedad 146 (84 %)	Con enfermedad 28 (16 %)	p
Sexo femenino	121 (83 %)	22 (79 %)	NS
Joven (< 45 años)	58 (40 %)	18 (64 %)	0,01
Incidental	47 (32 %)	3 (11 %)	0,02
Tiroidectomía total	121 (83 %)	22 (78 %)	NS
Vaciamiento Ganglionar	34 (23 %)	10 (35 %)	NS
Tamaño < 0,5 cm	53 (36 %)	10 (37 %)	NS
Multicéntrico	39 (26 %)	4 (14 %)	NS
Papilar clásico	115 (79 %)	17 (63 %)	NS
MTS al diagnóstico	0 (0 %)	1 (3 %)	0,02
Tg preablativa			
1) 0,1-2 ng/ml	72 (59 %)	4 (25 %)	< 0,001
2) 2,1-10 ng/ml	39 (32 %)	3 (19 %)	
3) 10,1-20 ng/ml	6 (5 %)	3 (19 %)	
4)> 20 ng/ml	6 (5 %)	6 (35 %)	
Meses en seguimiento (X± DS)	52 ± 37	32 ± 30	< 0,01

TABLA IV. Análisis regresión logística para variables predictoras del estado final "Libre de Enfermedad"

LE	OR	IC 95 %	p
Incidental	5,03	0,59-43	0,59
Joven	0,37	0,10-1,3	0,10
Tg > 20 ng/dl	0,07	0,014-0,35	0,001

TABLA V. Características diferenciales de pacientes < y > de 45 años

	< 45 años (%) (n = 76)	> 45 años (%) (n= 98)	p
Incidental	15 (19,74)	35 (35,71)	0,021
Tiroidectomía total	58 (76)	85 (86)	0,075
MTS ganglionar	12 (15,7)	13 (13,2)	0,63
Ausencia de MTS distancia	76 (100)	97 (98)	0,37
Tg preablativa			
1) 0,1-2 ng/ml	25 (45,4)	51 (68)	0,22
2) 2,1-10 ng/ml	18 (32,8)	24 (28)	
3) 10,1-20 ng/ml	5 (9)	4 (5)	
4 > 20 ng/ml	7 (12,8)	5 (6)	

que en los centros previamente nombrados fue de 49,7 %[13], 57 %[14] y 94,2 % respectivamente[15]. Nuestros datos no permiten identificar cuántas de las disecciones fueron profilácticas, pero en nuestro país la mayoría de los centros no realiza vaciamiento ganglionar profiláctico en microcarcinomas.

En nuestra serie, el hallazgo incidental se presentó en el 29,4 % de los pacientes, cuya indicación quirúrgica fue principalmente el tamaño del bocio. Diferentes autores comunican cifras dispares de microcarcinoma incidental, que van del 13 %[14] hasta el 67 %[15]. Estas diferencias podrían explicarse por un reciente estudio epidemiológico belga, el cual ha asociado positivamente la tasa de incidencia global de cáncer de tiroides a la tasa de cirugía tiroidea por patología benigna[16].

En relación a la evolución al final del seguimiento, el 84 % de nuestros pacientes se encontraba libre de enfermedad, confirmando el excelente pronóstico de estos tumores. Esta cifra es algo menor a la referida por algunos autores[12,15]. La diferencia no puede ser atribuida a una conducta terapéutica más conservadora, dado que en esta serie, el tratamiento fue comparativamente más agresivo. Consideramos que podría ser debido a los diferentes tiempos de seguimiento en los distintos trabajos ya que el tiempo promedio de aparición de recurrencias, es de alrededor de 2 años[17].

En cuanto a la identificación de factores de riesgo con importancia pronóstica, el análisis bivariado demostró que la edad menor de 45 años, la Tg preablativa mayor de 20 ng/ml y la presencia de

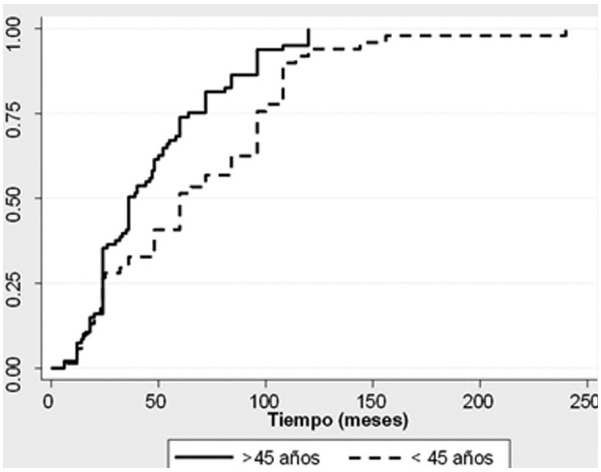


Gráfico I. Análisis de supervivencia según la Edad de los pacientes (p = 0,010)

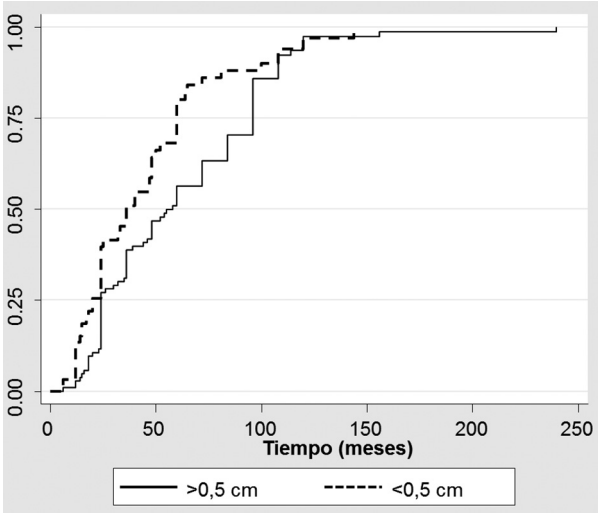


Gráfico II. Análisis de supervivencia según el tamaño tumor (p = 0,017)

MTS a distancia se asociaron a un peor pronóstico. En cambio, el hallazgo incidental estuvo asociado a una mayor probabilidad de encontrarse libre de enfermedad al final del seguimiento. En el análisis multivariado la Tg preablativa mayor de 20 ng/ml fue el único factor pronóstico independiente para la persistencia/recurrencia de la enfermedad. Por otra parte, el análisis de Kaplan-Meier mostró que una edad mayor de 45 años, un tamaño menor de 5 mm y una Tg preablativa menor de 20 ng/ml fueron predictores de un menor tiempo para alcanzar el estado libre de enfermedad. Estos resultados permiten inferir que una Tg preablativa mayor de 20 ng/ml es indicadora de un pronóstico final menos favorable, y de una evolución más

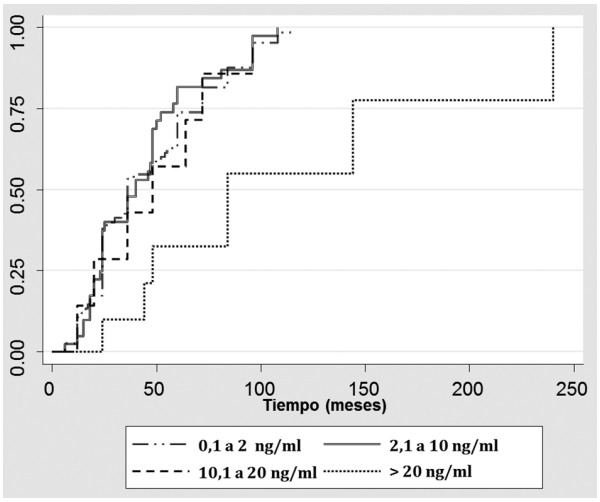


Gráfico III. Análisis de suervivencia según el valor de TG preablación (p = 0,011)

tórpida en términos del tiempo en el que se logra la remisión. Cabezón y col.[18] comunicaron que un valor de Tg mayor de 10 ng/ml se asociaba a un peor pronóstico del carcinoma diferenciado de tiroides. Esta diferencia en el valor de corte de Tg preablativa puede deberse a diferencias en la población estudiada, diferentes tratamientos iniciales y diferentes rangos de estratificación de los valores de Tg.

En esta serie la presencia de adenopatías no se relacionó con la evolución, a diferencia de lo referido por otros autores. Consideramos que esto puede ser debido a la baja prevalencia de las mismas en la población analizada.

La edad es un tradicional parámetro de mejor pronóstico de mortalidad según TNM. En nuestro trabajo, no encontramos diferencias en el pronóstico, pero los pacientes menores de 45 años requirieron más tiempo para lograr el estado libre de enfermedad. Estos resultados son similares a los descriptos por Ito y col.[19] en el seguimiento a 10 años en 1235 pacientes con MCDT sin cirugía, demostrando mayor progresión de la enfermedad en cuanto a tamaño y aparición de nuevas MTS ganglionares en pacientes menores de 40 años (OR 2,5; IC 95 % 1,36-4,6), sin registrar MTS a distancia o muertes por MCDT. En coincidencia con Ito, Miyauchi y col. atribuyeron esto a un comportamiento diferencial de los microcarcinomas según la edad, con un genio más agresivo en los pacientes menores de 40 años[20]. Estos datos son coincidentes con la experiencia de otros autores que evaluaron pacientes menores de 18 años, y

que concluyen que en ese grupo etario, el comportamiento tumoral es más agresivo[21,22]. Por su parte, Pedrazzini y col.[23] también identificaron la edad menor de 45 años como un factor predictor de recurrencia en microcarcinomas en una población que fue sometida a cirugía y ablación con radioiodo (OR 6.9; IC95 %1,59-29,9; p <0.002).

En resumen, podemos decir que el MCDT fue más frecuente en mujeres y en un tercio de la población correspondió a un hallazgo quirúrgico incidental. En los no incidentales más del 40 % tenía un nódulo palpable. En esta serie la mayoría de los pacientes fueron sometidos a tratamiento convencional (cirugía + radioablación con I^{131}+ tratamiento supresivo).

En cuanto a los factores pronósticos, la edad menor de 45 años, el tamaño tumoral mayor a 0,5 cm y la Tg preablativa mayor a 20 ng/ml se relacionaron significativamente con un mayor tiempo para alcanzar un estado libre de enfermedad. La Tg preablativa mayor de 20 ng/dl resultó el único factor pronóstico independiente de peor evolución.

En coincidencia con lo reportado por otras series, el 84 % de los pacientes se encontró libre de enfermedad al final del seguimiento, avalando el buen pronóstico de esta patología.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Davies L1, Welch HG**. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002 JAMA. May 10; 295(18):2164-7, 2006
2. **Durante, G. Costante, S. Filetti.** Differentiated thyroid carcinoma: defining new paradigms for postoperative management. Endocrine Related Cancer 20:4, R141-R154, 2013
3. **Davies L, Welch HG** Current thyroid cancer trends in the United States, JAMA Otorhynolalringol- Head and Neck Surgery 140(4):317-322, 2014
4. **Harach HR, Franssila KO, Wasenius VM.** Occult papillary carcinoma of the thyroid. A "normal" finding in Finland. A systematic autopsy study. Cancer. 56 (3): 531-581, 1985
5. **Yamamoto Y, Maeda T, Izumi K, Otsuka H.** Occult papillary carcinoma of the thyroid. A study of 408 autopsy cases. Cancer. 65(5):1173-1179, 1990
6. **Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM.** Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Thyroid 19:1167-1214, 2009
7. **Pitoia F, Califano I, Vázquez A, Faure E, Gauna A, Orlandi A, Vanelli A, Novelli JL, Mollerach A, Cabezón C, Fadel A, San Martín A, Figari M.** Consenso Intersocietario sobre tratamiento y seguimiento de pacientes con cáncer diferenciado de tiroides. Rev Argent Endocrinol Metab 51(2):85-118, 2014
8. **Pacini F.** Thyroid Microcarcinoma. Best Practice and Research Clinical Endocrinology and metabolism. 26(4):421-429, 2012
9. **Chen AY, Jemal A, Ward EM** Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005. Cancer. Aug 15;115(16):3801-7, 2009
10. **Davies L, Welch HG.** Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. JAMA 295:2164-2167, 2006
11. **Ercolano MA, Gauna A** Mortalidad por cáncer de tiroides en Argentina. Período 2005-2009 Rev Argent Endocrinol Metab 48 (supp):71, 2011
12. **Pitoia, F.; Novelli, J.L.; Herrera, C.J.; Salvai, M.E.; Mana, D.L.; Ilera, V.; Loto, M.G.; Roccatagliata, G.; Misiunas, A.L.; Niepomniszcze, H** Los microcarcinomas papilares tienen un pronóstico similar comparado con los tumores papilares entre1 y 2 cm de diámetro: estudio de 331 casos. Rev Argent Endocrinol Metab 43 (sup):69, 2006
13. **Mercante G, Frasoldati A, Pedroni C, Formisano D, Renna L, Piana S, Gardini G, Valcavi R, Barbieri V.** Prognostic factors affecting neck lymph node recurrence and distant metastasis in papillary microcarcinoma of the thyroid: results of a study in 445 patients. Thyroid 19:707-716, 2009
14. **Hay ID, Hutchinson ME, Gonzalez-Losada T, McIver B, Reinalda ME, Grant CS, Thompson GB, Sebo TJ, Goellner JR.** Papillary thyroid microcarcinoma: a study of 900 cases observed in a 60-year period. Surgery 144(6): 980-988, 2008
15. **Baudin E, Travagli JP, Ropers J, Mancusi F, Bruno-Bossio G, Caillou B, Cailleux AF, Lumbroso JD, Parmentier C, Schlumberger M.** Microcarcinoma of the thyroid gland: the Gustave-Roussy Institute experience. Cancer 83(3):553-9, 1998
16. **Van den Bruel A, Francart J, Dubois C, Adam M, Vlayen J, De Schutter H, Stordeur S, Decallonne B.** Regional variation in thyroid cancer incidence in Belgium is associated with variation in thyroid imaging and thyroid disease management. J Clin Endocrinol Metab 98:4063-4071, 2013
17. **Arora N, Turbendian HK, Kato MA, Moo TA, Zarnegar R, Fahey TJ 3rd.** Papillary thyroid carcinoma and microcarcinoma: is there a need to distinguish the two? Thyroid 19(5):473-477, 2009
18. **Cabezón C, Löwenstein A, Orlandi A., Sartorio G., Sobrado P.** y Miembros del Departamento de Tiroides de la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo (SAEM). Utilidad de la Tiroglobulina Sérica Preablación (Tg) como predictor de evolución en pacientes con carcinoma diferenciado de tiroides. Rev Argent Endocrinol Metab 46 (sup):49-52, 2009
19. **Ito Y, Miyauchi A, Kihara M, Higashiyama T, Kobayashi K, Misha A** Patient age is significantly related to the progression of papillary microcarci-

noma of the thyroid under observation. Thyroid Jan;24 (1):27-34, 2014

20. **Ito Y, Miyauchi A, Kihara M, Higashiyama T, Kobayashi K, Miya A.** Relationship of biochemically persistent disease and thyroglobulin-doubling time to age at surgery in patients with papillary thyroid carcinoma. Endocrine Journal 60 (4), 415-421, 2013
21. **Schlumberger M, De Vathaire F, Travagli JP, Vassal G, Lemerle J, Parmentier C, Tubiana M.** Differentiated thyroid carcinoma in childhood: long term follow-up of 72 patients. J Clin Endocrinol M 65:1088-94, 1987
22. **Dottorini ME, Vignati A, Mazzucchelli L, Lomuscio G, Colombo L.** Differentiated thyroid carcinoma in children and adolescents: a 37-year experience in 85 patients. J Nucl Med 38:669-675, 1997
23. **Pedrazzini L, Baroli A, Marzoli L, Guglielmi R, Papini E.** Cancer recurrence in papillary thyroid microcarcinoma: a multivariate analysis on 231 patients with a 12-year follow-up. Minerva Endocrinol 38(3):269-279, 2013

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Copyright ® 2015 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Vol 52 • Nº 3

TRABAJO ORIGINAL

A Comparison of Serum Testosterone (T) Measurements by Various Methods, Employing Current Validated Techniques or Otherwise, and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). A Multicentric Study

Comparación de los resultados de testosterona (T) por cromatografía líquida en tandem con espectrometría de masa (LC-MS/MS) y por kits comerciales convalidados o no por LC-MS/MS

Scaglia HE, Buccini G, Chichizola C, Colombani ME, Corazza N, Corthey C, Guevel L, Ibañez G, Lacoste, E, Nosetto S, Piaggio R, Riesco O, Sandoz, S, Scaglia J, Viola, AM, Wolfthal D, Zylbersztein CC

Hormone Determination Laboratory, Hospital Italiano, La Plata, ARGENTINA. The various participants in this study preformed their hormone determinations in their private clinical biochemistry practices.

ABSTRACT

Objective: To compare normal and hirsute women Testosterone (T) measurements performed at different laboratories by the same or different methods, and the gold standard method LC-MS/MS (Quest Diagnostics, USA).
Design: Prospective study.
Setting: Hormone Determination Laboratory, Hospital Italiano, La Plata, and each participating laboratory's private practice.
Patient(s): Blood samples were obtained from 23 individuals sorted into two groups, namely, normal women, n: 11(NW) and hirsute women, n: 12 (HW).
Interventions(s): None.
Main Outcome Measure(s): To evaluate whether serum T measurements obtained from each serum by the methods currently employed in our country, some of whose kits exhibit changes in previous presentations, some LC-MS/MS-validated and other non-validated ones are significantly different from those obtained by LC-MS/MS.
Result(s): None of the 11 NW showed high T values by LC-MS/MS. Two out of the 12 hirsute patients showed normal T values (LC-MS/MS). Methods and number of participating labs -shown between brackets were: in NW, 1st generation Architect (1), 2nd generation Architect (1); Immulite (1) Cobas (4); Access (1); Centaur (2); Immunotech-RIA (1); and, in HW, 2nd generation Architect (3); Immulite (3); Cobas (4); Access (1); Centaur (2); Immunotech-RIA (1). No false positives resulted from the assays performed.
No lab yielded false positive results in the NW group. No false positives were reported from the 10 hirsute women with increased T values by LC-MS/MS. False positives, though, resulted from two female hirsute patients with normal T values studied by four of the methods.
Statistically, the serum T measurements obtained were significantly different by Centaur in NW and, in HW, by Immulite and Centaur as compared to LC-MS/MS. In the Bland-Altman plot, Centaur and Cobas showed over 5 % of measurements outside the limits of agreement in the HW group. Assessment by p-Spearman resulted in divergences with LC-MS/MS for all methods in NW, whereas in the HW group there were none. When estimating sampling bias for each laboratory taking LC-MS/MS as the reference method and adopting a ± 6.4 % mean bias acceptability criterion for each method compared to LC-MS/MS, two of the techniques reviewed, 2nd generation Architect and Cobas, met the validation requirement satisfactorily. However, one

Recibido: 21-04-2015 Aceptado: 02-06-2015

Correspondencia: Correspondence should be addressed to: Hugo E Scaglia, PhD, Calle 59 #969, (1900) La Plata, ARGENTINA. (E-mail: info@iabe.com.ar)

lab out of three using 2nd generation Architect failed to meet the validation requirement, while two out of four labs using Cobas also failed to meet the requirement. This demonstrates the great variability among methods, even when labs are employing the same technique.
Conclusion: From the clinical point of view, the methods currently used in our local environment yielded no false positives or false negatives and therefore did not misdiagnose hyperandrogenism. Still, Immulite, Centaur, RIA and Access did present false positives in two of the T-normal hirsute women. The relation of serum T measurements obtained by each method to measurements obtained by LC-MS/MS reveals that the dispersion of the results was larger with values under 0.3 ng/ml, quite close to the detection limit of the various techniques. **Rev Argent Endocrinol Metab 52:137-152, 2015**

No financial conflicts of interest exist.

Key words: testosterone, testosterone assay, LC-MS/MS

RESUMEN

Objetivos: Comparar los resultados de testosterona **(T)** obtenidos en diferentes laboratorios en mujeres normales (MN) e hirsutas (MH), empleando el mismo o diferentes métodos respecto a la técnica de cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masa LC-MS/MS (gold standard) realizada en el laboratorio Quest (USA)
Protocolo: Estudio prospectivo
Estudio realizado en: Laboratorio de Determinaciones Hormonales; Hospital Italiano de La Plata y en los laboratorios privados de cada participante
Pacientes: Se obtuvieron muestras de sangre periférica en 23 mujeres agrupadas en 2 grupos: controles normales (n:11) y en mujeres hirsutas (n: 12)
Intervención: Ninguna.
Principales resultados a evaluar: Evaluar si con los métodos habituales empleados en nuestro medio con los diferentes kits comerciales, de los cuales algunos han sido convalidados por técnica "gold standard" y otros no, presentan diferencias significativas con los obtenidos por LC-MS/MS
Resultados: Los resultados obtenidos por LC-MS/MS mostraron que ninguna de las 11 MN tuvieron niveles aumentado de T y 2 MH tuvieron valores normales de T. Los métodos empleados y el número de laboratorios (entre paréntesis) que emplearon cada método fueron en MN Architect 1st generation (1) Architect 2nd generation (1); Immulite (1); Cobas (4); Access (1); Centauro (2); Immunotech-RIA (1). En las MH Architect 2nd generation (3); Immulite (3); Cobas (4); Access (1); Centauro (2); Immunotech-RIA (1). En el grupo de MN en ningún laboratorio (lab) se obtuvieron resultados falsos positivos. En el grupo de MH no se obtuvieron falsos negativos en las 10 hirsutas con valores aumentados de T por LC-MS/MS. En las 2 pacientes hirsutas con T normal en 4 métodos se obtuvieron falsos positivos
Estadísticamente los resultados fueron significativamente diferentes, en las MN por Centauro y en las MH por Immulite y Centauro. En el análisis de Bland-Altman Centauro y Cobas en las MH presentaron más del 5 % de los resultados fuera del límite de acuerdo. Resultados por p-Speerman todos los métodos fueron diferentes a LC-MSMS en las MN y no se obtuvieron diferencias en el grupo de MH. Evaluando el bias de cada muestra en cada laboratorio respecto a LC-MS/MS y adoptando el criterio de aceptabilidad de ± 6,4 % mean bias de cada método respecto al de LC-MS/MS, 2 de las metodologías estudiadas, Architect 2da generación y Cobas pasaron satisfactoriamente el requisito de validación, sin embargo de los 3 laboratorios que emplearon 2da generación, 1 no pasó el criterio de validación y de los 4 que usaron Cobas, 2 tampoco lo pasaron. Esto demuestra la gran variabilidad de los métodos aun entre lab que emplean la misma técnica.
Conclusiones: Desde el punto de vista clínico los métodos habitualmente empleados en nuestro medio, no sobrediagnosticaron o subdiagnosticaron hiperandrogenismo, por no presentar falsos positivos o negativos respectivamente. Sin embargo Immulite, Centauro, RIA y Access presentaron falsos positivos en las 2 hirsutas con T normal. En la relación de los resultados de cada muestra en cada método sobre el valor de LC-MS/MS referido a la concentración de T en ese suero por LC-MS/MS, la mayor dispersión de los resultados se observaron con valores menores de 0,3 ng/ml, muy cercano al límite de detección de las diferentes técnicas. **Rev Argent Endocrinol Metab 52:137-152, 2015**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés

Palabras clave: testosterona, determinación de testosterona, LC-MS/MS

INTRODUCTION

Markers in the diagnosis of hyperandrogenemia with or without hirsutism in women include increased levels of serum T. It has been widely demonstrated that commercial immunoassays show great disparity at low T levels such as are usually found in women. Based on these findings, in a previous study we quantified T levels in aliquots of the same serum sample in 24 normal women (NW) and 15 hirsute women (HW). Aliquots of each sample were assayed in 18 laboratories by means of the current methods in use locally: 5 automated methods (Abbott: Axsym and Architect; Vidas; Siemens Immulite and Roche Elecsys); 3 manual coated tube RIA: Siemens, DSL, DiaSource and one in-house-developed RIA method by one of the laboratories following the consensus guidelines from the Endocrine Society[1]. Serum T measurements obtained for each serum by the methods currently employed in each lab were compared to those obtained by LC-MS/MS (Quest Diagnostics, USA)[2].

In conclusion, and in keeping with results obtained in previous studies[1,3-5], our findings clearly demonstrate that none of the immunoassays employed locally satisfactorily meets the degree of precision required for evaluating T concentrations under 3.0 ng/ml, as corresponds to the measurements obtained for women and children.

In our previous study, and in line with earlier publications[6], we showed that it is an issue of paramount relevance to be able to compare testosterone measurements resulting from assays by various testing methods and by the same method implemented at different labs. As an attempt to standardize pre- and post analytical aspects of the assessment process and to establish a reliable, consistent reference range, which remains an enduring problem with laboratories, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'s Hormone Standardization Project (CDC-HoST Program), National Center for Environment Health, Division of Laboratory Sciences, has put forward the following guidelines:

a) Implementing a standardization program to assay steroid hormones[7]
b) Establishing a common calibration standard, that is, a primary standard[8]
c) Specifying the matrix employed by commercial kit manufacturers to calibrate their immunoassays[9].
d) Referring the technique of choice to a reference method[10,11]. It is crucially important to accurately establish the reference ranges obtained from a population, which should, in turn, be well characterized with an adequate sample size of and using a well-established standardization procedure.

At present some laboratories supplying commercial kits for Testosterone testing claim in their inserts that results are validated with LC-MS/MS.

The aims of this study were as follows:

1. Ascertaining whether the serum T measurements obtained by testing with these new kits tie in with those obtained with a gold standard LC-MS/MS method. To that end, we carried out a fresh comparative study of T testing in normal and hirsute women using various commercial kits, some of which claim in their inserts that the method in question is LC-MS/MS-validated and others that do not specify such validation. The measurements thus obtained were statistically gauged between methods and by reference to Quest Diagnostics LC-MS/MS, in turn validated by the Centers for Disease Control and Prevention Hormone Standardization Program (CDC-Host Program), Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) and FDA.
2. Comparing T measurements in normal women by employing non-validated Abbott Architect, which we shall identify as 1st generation Architect, and 2nd generation Architect, this latter one validated by LC-MS/MS, so as to check whether the alterations made indeed significantly modify T values.

MATERIALS AND METHODS

Our multicentric study was carried out by 17 researchers in 14 clinical biochemistry laboratories in which blood samples corresponding to various clinical conditions were collected following previously established inclusion / exclusion criteria.

The subjects whose serum samples were analyzed in this study were not under any treatment whatsoever and did not present any endocrine disorders or non-endocrine disease that could interfere with T determination. Hirsute women showed an increased score according to Ferriman–Gallwey[12] criteria, with or without acne and / or loss of scalp hair, and with or without menstrual cycle alterations. Normal women did not present

hirsutism, had regular menstrual cycles and ovulatory progesterone levels measured in the luteal phase in some of them.

Blood samples were obtained from 25 individuals sorted into two groups, namely, normal women (n: 11) and hirsute women (n: 12). Two blood samples corresponding to 2 hirsute patients were discarded.

The blood samples were collected in tubes containing no anti-coagulants or preservatives and the serum was obtained by centrifugation. For all samples, 13 aliquots of at least 0.5 ml were obtained and kept at -20ºC until they were sent to each of the labs participating in the study for assay of serum T by the methods currently used by each participating lab. A 2ml aliquot was kept until all the samples had been collected, so as to have them all sent on together for assay by LC-MS/MS (Quest Diagnostics, USA).

The techniques employed are detailed as follows:

Normal women:

Abbott Architect - 1st generation: 1 lab;

Abbott Architect - 2nd generation: 1 lab;

Siemens Immulite: 1 lab;

Roche Cobas: 4 labs;

Beckman Access: 1 lab;

Centaur: 2 labs;

Bio Analytical Immunotech - manual coated tube RIA: 1 lab.

Hirsute women:

Abbott Architect - 2nd generation: 3 labs;

Siemens – Immulite: 3 labs;

Roche – Cobas: 4 labs;

Beckman – Access: 1 lab;

Centaur: 2 labs;

Bio Analytical Immunotech - manual coated tube RIA: 1 lab.

The calibration standards of the methods in this study correspond to their inserts. Of all the methods employed in this study, only second generation Architect – Abbott and Cobas – Roche report that they have been validated with LC-MS/MS.

Blood sampling for both groups was performed in two separate stages four months apart from each other. Within this intermediate period some of the labs changed their methods, which explains why in some cases the methodology differed from one group to another. The reason that there are three labs less in the NW group is that one of the labs originally used the Abbott Axsym technique and later changed to 2nd generation Abbott Architect. Abbott Axsym was not used in the HW group, which, for the purpose of this study, resulted in the need to dispose of the measurements obtained in the NW group by such method. Another two labs were unable to process the samples due to technical reasons.

The measurements obtained from each serum by the methods currently employed in each lab were compared to those obtained by LC-MS/MS (Quest Diagnostics, USA)[12].

STATISTICAL STUDY

Descriptive statistics: mean, standard deviation (SD), median, minimum and maximum were calculated for each one of the methods in both experimental groups.

The serum T concentrations measured through each one of the 7 methods with normal women and of the 6 methods used with hirsute women were compared with those obtained by LC-MS/MS using paired-sample Wilcoxon non-parametric signed-rank test. Pearson's correlation coefficient was calculated among the values obtained by LC-MS/MS and by each one of the methods. The test was done in order to analyze whether the correlation was significantly different from 0 (zero).

In order to analyze the concordance of each one of the methods with one another and with LC-MSMS, Bland–Altman[13] plot was performed. Limits of agreement were calculated by estimating the mean difference ±1.96 standard deviation (STD) of the differences.

Weighted Deming regression[14] was run on each of the different determination procedures from which LC-MS/MS was taken as independent variable (x) and the method as dependent variable (y). This equation permits finding the ratio between the two methods.

Overall mean bias was also calculated for each lab versus LC-MS/MS.

This research was carried out pursuant to the ethical standards of the Declaration of Helsinki.

RESULTS

T measurements were analyzed in serum samples from 23 individuals sorted out into 2 groups: NW (n: 11) and HW (n: 12). Quantifications of T were performed in 14 laboratories from aliquots of the same blood sample by applying both the testing

techniques customarily used in such labs and LC-MS/MS. This paper reports a comparative analysis of the measurements from NW and HW resulting from T testing by various methods in current use in our area against those obtained by LC-MS/MS.

Figure 1 shows results of T tested by LC-MS/MS on normal women and on patients with hirsutism, with or without acne and with or without cycle abnormalities (Quest Diagnostics, Nichols Institute). As can be seen, the method yielded increased T values for 10 out of the 12 hirsute women.

Figure 2 shows marked differences in the measurements of aliquots from 11 NW by the early version of Abbott Architect, 1st generation Architect, and by the modified LC-MS/MS-validated technique, 2nd generation Abbot Architect. As can be observed, there was a significant difference between the two methods.

Figures 3 to 7 reflect the relation between serum Testosterone levels obtained by different methods and by the different labs working with the same methodology (3 labs with 2nd generation Architect, 4 labs with Cobas, 3 labs with Immulite and 2 labs with Centaur). The figures also show comparative results between laboratories using the same method and LC-MS/MS.

With 2nd generation Architect (Figure 3) none of the serum samples yielded increased T levels (no false positives resulted from the assay) in the NW group. As for the HW group, whenever T levels were increased by LC-MS/MS, they were so by the former as well (there was no record of false positives, either). As regards the two hirsute patients with normal serum T values by LC-MS/MS, their measurements were also normal according to the standards referred to as normal values in the commercial kit insert (up to 0.55ng/ml). The HW group showed good matching among the different labs, between each other and by reference to LC-MS/MS, with measurements slightly above, though not significantly higher, in Lab 3.

No false positives or false negatives were found in the four labs testing by Cobas (Figure 4) in the NW group and the HW group respectively. Note, though, that there is greater dispersion in the NW group and very good matching among the participating labs and against LC-MS/MS (Figure 5).

Testing by Immulite (Figure 6) did not yield false positives in the NW group. No false negatives resulted from the HW group, either. In the latter group great dispersion was observed in the measurements from the various labs (bottom right-hand side of the figure). In Lab 3, sample 12, which had yielded normal values, revealed an increased T value (false positive) by LC-MS/MS.

In the two labs using Centaur (Figure 7 top left) the measurements obtained for all the samples from the NW group were higher than those resulting from LC-MS/MS testing. In both labs, sample

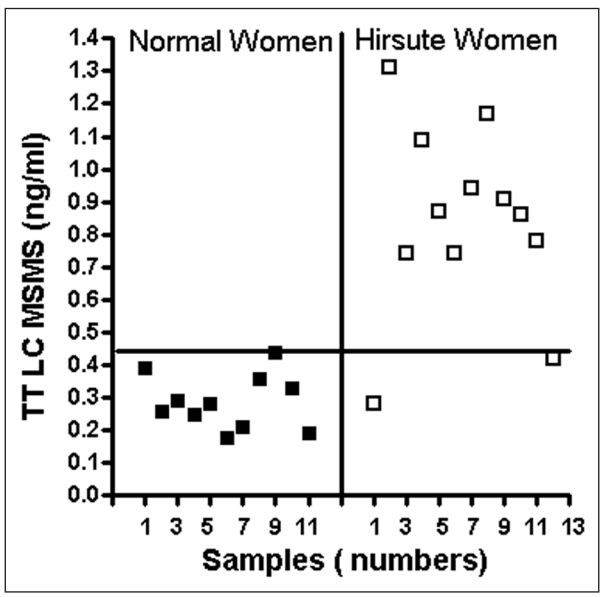


Figure 1. Measurements of TT tested by LC-MS/MS in normal women and in patients with hirsutism, with or without acne and with or without cycle abnormalities (Quest Diagnostics, Nichols Institute).

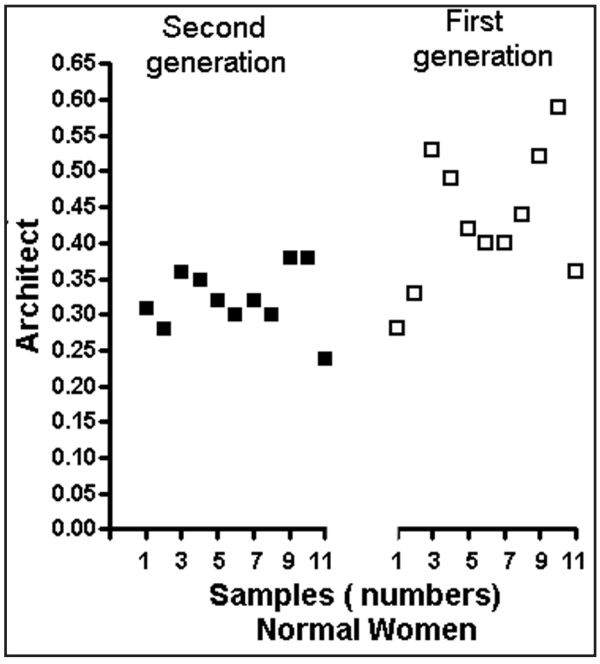


Figure 2. Testosterone measurements in same serum aliquots from 11 normal women as determined by 1st generation Architect (right side of figure) against 2nd generation Architect (left side of figure).

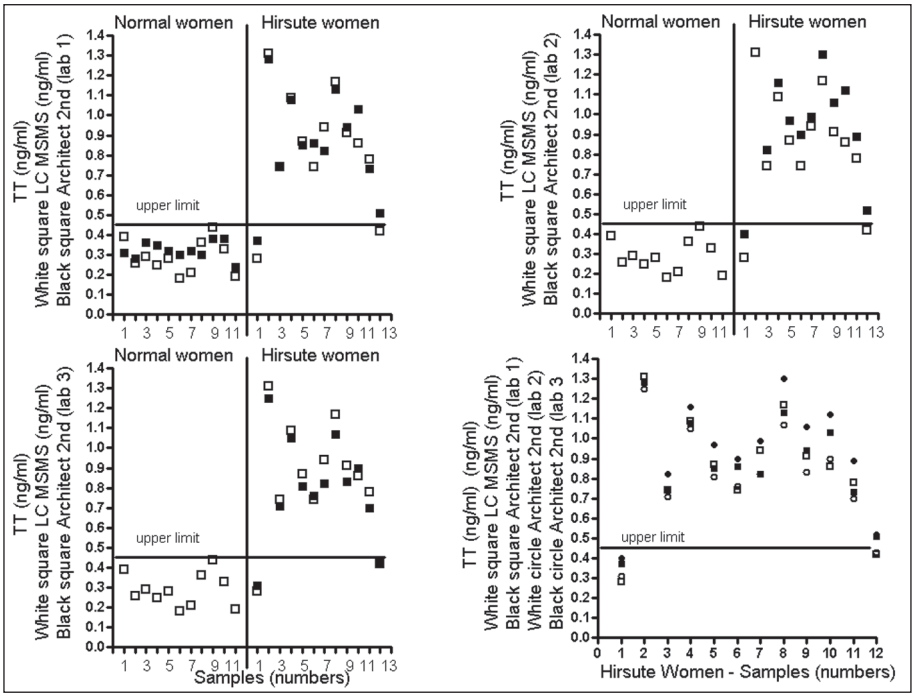


Figure 3. shows the relation between Testosterone levels obtained by the three laboratories (lab1, lab 2 and lab 3, top left, top right and bottom left, respectively) using Abbott and 2nd generation Architect commercial kits (■), and LC-MS/MS (□) both in normal and hirsute women. The straight line of each set indicates the upper limit for normal women obtained by LC-MS/MS. Bottom right is shown the relation between every LC-MS/MS-determined serum and each of the three labs involved for the hirsute women group. (LC-MS/MS □; Architect 2nd generation, laboratories 1■, 2 ○ and 3 ●, respectively)

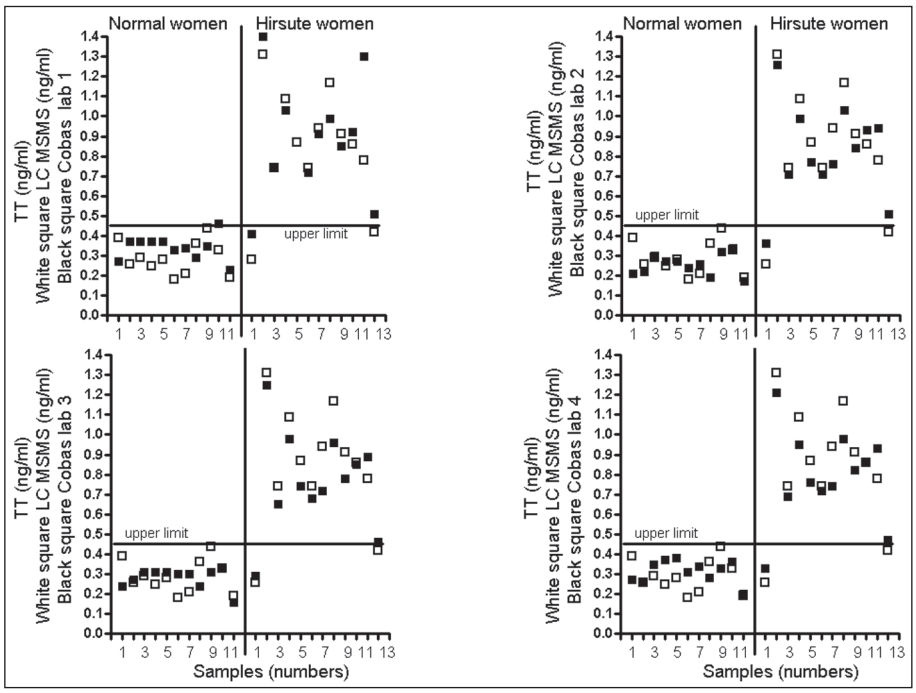


Figure 4. shows the relation between Testosterone levels obtained by the four labs (labs 1, 2, 3 and 4 top left, top right, bottom left and bottom right, respectively), using the Roche commercial kit -Cobas (■) and LC-MS/MS (□) in both normal and hirsute women. The straight line of each set indicates the upper limit for normal women obtained by LC-MS/MS.

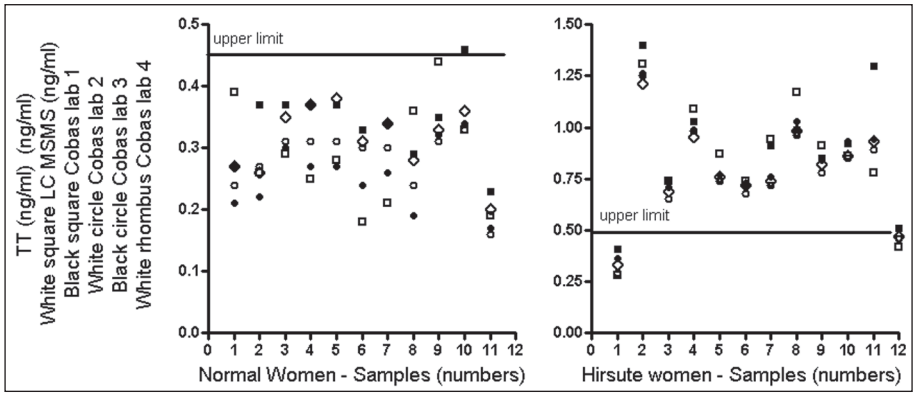


Figure 5. Relation of Testosterone levels in each LC-MS/MS-determined serum (□) and for each of the four labs, using the Roche commercial kit -Cobas (lab 1 ■), (lab 2 ○); (lab 3 ●) (lab 4 ◇) both in normal women (left) and in hirsute women (right).

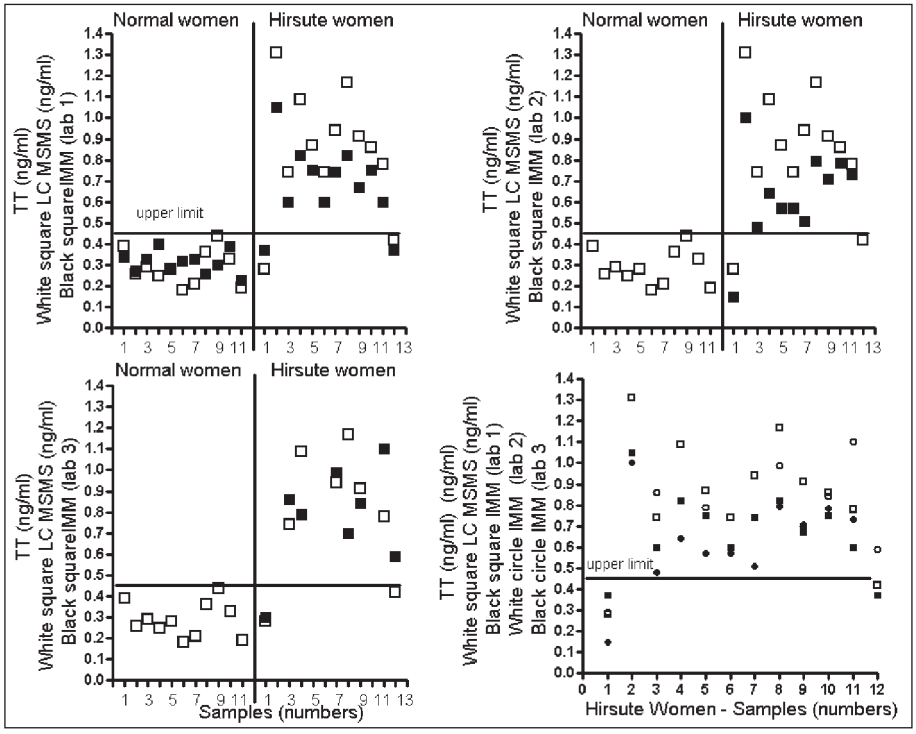


Figure 6. shows the relation between Testosterone levels obtained by the three labs (lab 1, 2 and 3 top left, top right and bottom left, respectively), utilizing the Siemens-Immulite commercial kit (■) and LC-MS/MS (□) both in normal and hirsute women. The straight line of each set indicates the upper limit for normal women obtained by LC-MS/MS. Bottom right is shown the relation of each LC-MS/MS-determined serum and each of the three labs involved for the hirsute women group (LC-MS/MS □; Immulite, laboratories 1■, 2 ● and 3 ○, respectively)

12 in the HW group showed increased T levels by Centaur compared to LC-MS/MS, and also by reference to the average normal values obtained in the course of the present study (left-hand side of Figure 7) and to the cut-off values of the kit insert (false positive).

Measurements obtained by Access technique in the NW group did not present false positives. In the HW group, samples 1 and 12, which had presented normal T values by LC-MS/MS, showed higher values by Access than the normal values obtained in this study as can be observed in the

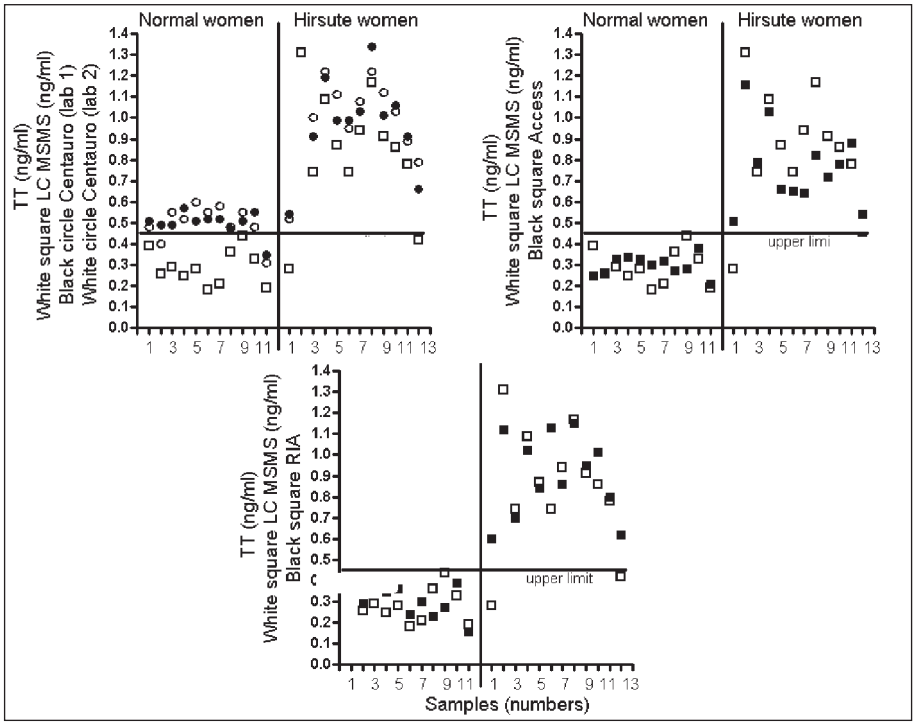


Figure 7. shows the relation between Testosterone levels obtained both in normal and hirsute women by two labs using Centauro method, lab 1● and lab 2 ○ (top left), another lab using Access (top right) and another one using manual RIA by means of an Immunotech kit (bottom left), and by LC-MS/MS (□) in normal and hirsute women. The straight line of each set indicates the upper limit for normal women obtained by LC-MS/MS.

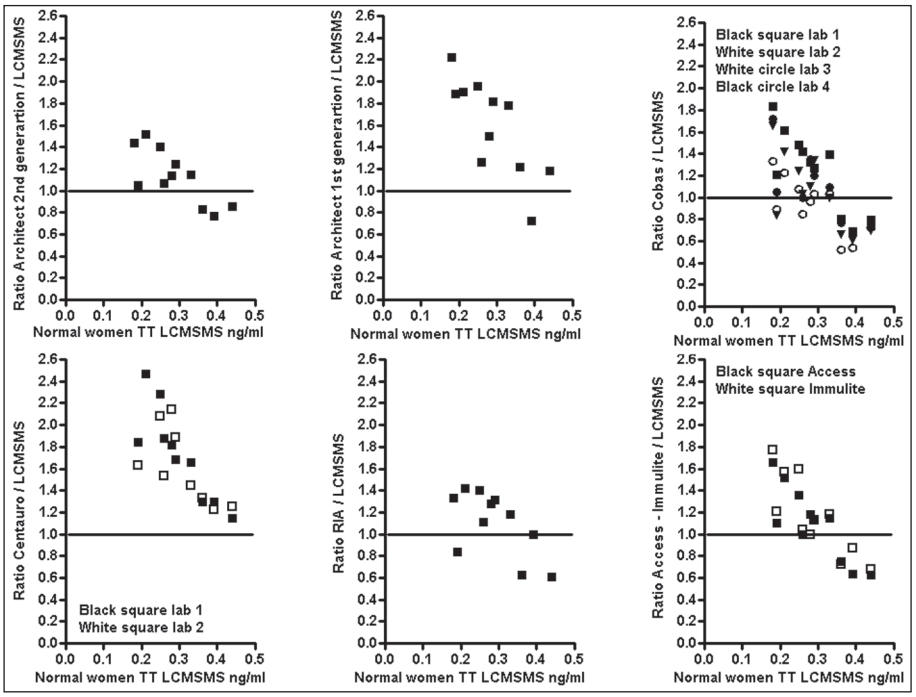


Figure 8. Relation between Testosterone levels obtained by various methods and by LC–MS/MS in normal women (Y axis) compared to the level obtained by LC MSMS (X axis). The different symbols in each set of measurements indicate the various laboratories that employed the same methodology.

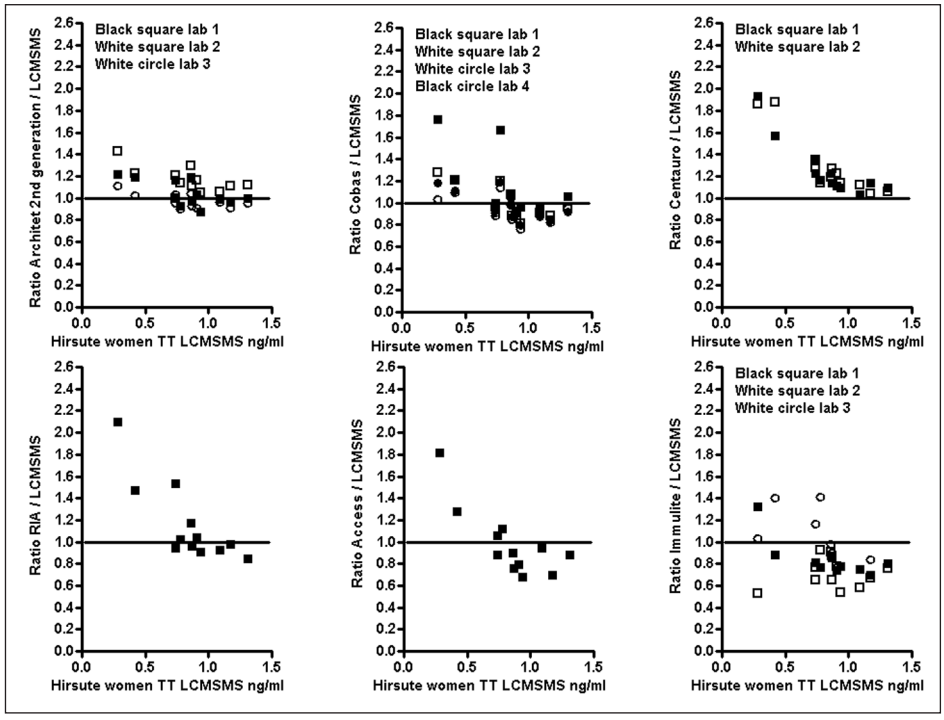


Figure 9. Relation between Testosterone levels obtained by various methods and by LC–MS/MS in hirsute women (Y axis) compared to the level obtained by LC MSMS (X axis). The different symbols in each set of measurements indicate the various laboratories that employed the same methodology.

left-hand side of the figure (false positive, Figure 7 top right).

Measurements by RIA (Figure 7 bottom left) did not exhibit any false positives in the NW group and, in the two hirsute patients with normal T values by LC-MS/MS (cases 1 and 11), increased T values were obtained against those of LC-MS/MS and even against the average normal values resulting from the present study (false positives).

On running Wilcoxon paired-sample test there were significant differences in measurements by 1st generation Architect and Centaur by reference to LC-MS/MS ($p<0.05$) in the NW group, whereas in the HW group there were differences for Architect (Lab 2), Cobas (Lab 3), Centaur and Immulite (both Labs 2 and 3) (See Tables 1 and 2)

By Bland-Altman plot T measurements from the NW group obtained by 1st generation Architect and Immulite (Lab 1), and from the HW group, by 2nd generation Architect (Lab 2), Centaur (Lab 2), Immulite (Lab 1) and Cobas (Lab 1) revealed one T value outside the limit of acceptability calculated as the difference of the mean SD ±1.96 of the difference between the measurement by LC-MS/MS and those for each method (Tables 3 and 4).

As regards Spearman's correlation coefficient, results were not statistically significant ($p> 0.05$ in all cases) in the NW group. However, with hirsute women all the methods showed a significant correlation ($p< 0.05$) (Tables 3 y 4). It is worth noting that in the NW group all the measurements fell close to the method quantification limit, which causes greater scattering of results.

The results of Weighted Deming regression are presented in Table 5. It can be seen that the values match those obtained by LC-MS/MS, since the closer to 1 the value of the slopes (and the closer to zero the values of the intercept) the closer the values of x and y, i.e. the method in question and the gold standard.

Figure 8 shows how measurements by each method relate to those by LC-MS/MS in the NW group and how they compare to the concentration obtained by LC-MS/MS. Greater scattering of results is apparent in all cases by reference to the ideal value 1, which proves excessive for 1st generation Architect and Centaur when T levels fall below 0.3 ng/ml.

Figure 9 shows how HW measurements by each method relate to those obtained by LC-MS/MS and how they compare to the LC-MS/MS concentration

TABLE 1. Testosterone immune assay values obtained by 11 different laboratories and LC MSMS from normal women

	LC MSMS	Arch 2 G	Arch 1 G	RIA	Acc	Cobas lab 1	Cobas lab 2	Cobas lab 3	Cobas lab 4	Cent lab 1	Cent lab 2	Imm
Mean	0.29	0.32	0.43	0.31	0.30	0.34	0.25	0.28	0.31	0.50	0.50	0.31
SD	0.08	0.04	0.09	0.08	0.05	0.06	0.05	0.05	0.06	0.06	0.08	0.05
n	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Median	0.27	0.32	0.42	0.30	0.30	0.35	0.26	0.30	0.33	0.51	0.52	0.32
Min	0.18	0.24	0.28	0.16	0.21	0.23	0.17	0.16	0.20	0.35	0.31	0.23
Max	0.44	0.38	0.59	0.39	0.38	0.46	0.34	0.33	0.38	0.57	0.60	0.4
"p"		0.213	**0.011**	0.507	0.721	0.100	0.423	0.760	**0.300**	**0.003**	0.003	0.359

Note: LCMSMS Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry. Min: Minimum; Max: Maximum
"p" Wilcoxon study
Arch 2G Architect 2nd generation (Abbott); Arch 1 G: Architect 1st generation (Abbott); Cobas (Roche)
RIA: Radioimmunoassay (Immunotech); Acc: Access; Cent: Centauro; IMM:Immulite.
p< 0.05 statistically different

TABLE 2. Testosterone immune assay values obtained by 13different laboratories and LC MSMS from hirsute women

	LC MSMS	Arch 2 G lab 1	Arch 2 G lab 2	Arch 2 G lab 3	RIA	Acc	Cobas lab 1	Cobas lab 2	Cobas lab 3	Cobas lab 4	Cent lab 1	Cent lab 2	Imm lab1	Imm lab2
Mean	0.84	0.86	0.97	0.80	0.90	0.77	0.89	0.82	0.77	0.79	1.01	1.04	0.68	0.63
SD	0.29	0.26	0.30	0.26	0.19	0.19	0.30	0.23	0.25	0.23	0.25	0.25	0.19	0.22
n	12	12	12	12	12	12	11	12	12	12	12	12	12	11
Median	0.87	0.86	0.98	0.82	0.91	0.75	0.91	0.81	0.76	0.79	1.00	1.06	0.71	0.64
Min	0.28	0.37	0.40	0.31	0.60	0.51	0.41	0.36	0.29	0.33	0.54	0.52	0.37	0.15
Max	1.31	1.28	1.47	1.25	1.15	1.16	2.48	1.25	1.26	1.21	1.43	0.54	1.05	1.00
"p"		0.625	**.002**	0.31	0.56	0.182	0.385	0.410	**0.028**	0.091	**.002**	**.002**	**.004**	**.003**

Note: LCMSMS Liquid Chromatography *tandem* Mass Spectrometry. Min: Minimum; Max: Maximum
"p" Wilcoxon study
Arch 2G Architect 2nd generation (Abbott); RIA: Radioimmunoassay (Immunotech); Acc: Access; Cent: Centauro; IMM:Immulite;Cobas (Roche). p< 0.05 statistically different

obtained. It is clear that for Architect and Roche there was a significant LC-MS/MS correlation. For both labs using Centaur, although excellent matching was achieved between the two, in all cases the relation was greater than 1. Immulite displayed great dispersion among the values obtained and Access and RIA showed a greater dispersion at concentrations below 0.5 ng/ml.

DISCUSSION

The comparative study of serum T obtained from the same normal and hirsute women aliquots, tested at different labs and in relation to each other, versus the Quest Diagnostics method using turbulent flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry[14] revealed significant differences for all the methods in the NW group, though not for all those in the HW group.

In hirsute women, T testing proves an essential diagnostic parameter in defining the physiological condition to be used jointly with clinical evaluation and ultrasound imaging. Indeed, hirsutism is associated with various conditions, most of which are defined by biochemical hyperandrogenism, that is, by levels of circulating androgens. As a first evaluation parameter of androgenic action Dehydroepiandrosterone-sulfate is assessed as a precursor of mainly adrenal origin and Total Testosterone and/or free Testosterone.

TABLE 3. Bland Altman ans Spearman correlation coefficient of the values of Testosterone by different methods compared to LCMSMS from normal women

	Arch 2 G lab 1	**Arch 1 G lab 2**	**RIA**	**Acc**	**Cobas lab 1**	**Cobas lab 2**	**Cobas lab 3**	**Cobas lab 4**	**Cent lab 1**	**Cent lab 2**	**Imm lab 1**
Bland-Altman analysis											
Mean difference	0.144	0.144	0.016	0.008	0.052	-0.035	-0.009	0.025	0.210	0.211	0.025
SD	0.071	0.109	0.092	0.097	0.098	0.084	0.090	0.094	0.090	0.109	0.094
Values outside the agreement limits mean ±1.96SD	0	**1 (9.1%)**	0	0	0	0	0	0	0	0	**1 (10%)**
Spearman coefficient	0.494	0.328	0.383	-0.023	0.121	0.301	0.201	0.073	-0.129	-0.037	0.729
sig bilateral – p (p Spearman)	**0.122**	**0.325**	**0.245**	**0.947**	**0.723**	**0.369**	**0.553**	**0.818**	**0.705**	**0.914**	**0.729**

Note: LCMSMS Liquid Chromatography tandem *Mass Spectrometry. Arch 2G Architect 2nd generation (Abbott); Arch 1 G: Architect 1st generation (Abbott); RIA: Radioimmunoassay (Immunotech); Acc: Access; Cent: Centauro;* Imm:Immulite; Cobas (Roche)

TABLE 4. Bland Altman ans Spearman correlation coefficient of the values ot Testosterone by different mthods compared to LCMSMS from hirsute women

	Arch 2 G lab 1	**Arch 2 G lab 2**	**Arch 1 G lab 3**	**RIA**	**Acc**	**Cobas lab 1**	**Cobas lab 2**	**Cobas lab 3**	**Cobas lab 4**	**Cent lab 1**	**Cent lab 2**	**Imm lab 1**	**Im lab 2**
Bland-Altman analysis													
Mean difference	0.019	0.124	-0.039	0.058	-0.078	0.179	-0.025	-0.072	-0.054	0.163	0.197	-0.164	-0.250
SD	0.083	0.055	0.054	0.173	0.176	0.683	0.104	0.098	0.105	0.062	0.830	0.115	0.137
Values outside the agreement limits mean ±1.96SD	0	**1 (8.3%)**	0	0	0	**1 (9.1%)**	0	0	0	0	**1 (8.3%)**	**1 (8.3%)**	0
Spearman coefficient	0.851	0.939	0.928	0.715	0.666	0.825	0.867	0.858	0.865	0.931	0.954	0.933	0.669
sig bilateral – p (p Spearman)	0.000	0.000	0.000	0.009	0.018	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024

Note: LCMSMS Liquid Chromatography tandem *Mass Spectrometry. Arch 2G: Architect 2nd generation (Abbott); RIA: Radioimmunoassay (Immunotech); Acc: Access; Cent: Centauro; Imm: Immulite; Cobas (Roche)*

The gold standard method for measuring free T is equilibrium dialysis, a procedure that is not routinely feasible in all clinical biochemistry labs. Alternatively, and with similar results to those of dialysis, FT can be calculated by using an equation based on the law of mass action[1] for which T value is one of the analytes. A wide range of papers describe how to calculate the distribution of circulating serum T[16-18]; there are also numerous links on the Internet to testosterone calculators, all of which employ T concentration as a constitutive element in the various formulas. Therefore, a proper calculation requires that serum T be measured by a validated, acceptably accurate technique using duly approved methods.

TABLE 5. Results of the regression equation weighted Deming. Lc MSMS method taking as the independent variable (x) and each method (y) as the dependent variable

Normal women Method	SD Intercept	Hirsute women Method	SD Intercept
Architec 2nd generation	0.069	Architec 2nd generation lab 1	0.014
Architec 1st generation	6.823	Architec 2nd generation lab 2	0.031
RIA	0.204	Architec 2nd generation lab3	0.011
Access	0.129	RIA	0.083
Cobas lab 1	0.203	Immulite lab 1	0.096
Cobas lab 2	0.101	Immulite lab 2	0.027
Cobas lab 3	0.208	Cobas lab 1	-1.310
Cobas lab 4	0.214	Cobas lab 2	0.052
Centauro lab 1	0.271	Cobas lab 3	0.255
Centauro lab 2	0.656	Cobas lab 4	0.033
Immulite	0.138	Centauro lab 1	0.036
		Centauro lab 2	0.004
		Access	0.172

TABLE 6. Bias of testosterone immuno assay by different methods respect to the LCMSMS from hirsute women. Criterion of satisfactory performance was ±6.4 % mean bias to the LC MSMS

Méthods	Arch 2nd Gen	Arch 2nd Gen	Arch 2nd Gen	RIA	IMM	IMM	Cobas	Cobas	Cobas	Cobas	Cent	Cent	Access
	lab 1	lab 2	lab 3		lab 1	lab 2	lab 1	ab 2	lab 3	lab 4	lab 1	lab 2	
%	2.3	14.7	4.6	6.8	-19.5	-31.5	18.9	-3.0	-8.5	-6.4	19.3	23.3	-9.2

Note: LCMSMS Liquid Chromatography tandem *Mass Spectrometry. Arch 2nd Gen: Architect 2nd generation (Abbott); RIA: Radioimmunoassay (Immunotech); Acc: Access; Cent: Centauro; Imm: Immulite; Cobas (Roche)*

As regards the commercial kits Abbott 1st and 2nd generation Architect, there are significant disparities. The former, a method not validated by LC-MS/MS, reveals major differences compared to the latter, 2nd generation Architect, and is substantially different from LC-MS/MS. The adjustments made in developing the new version, whose insert states that its results are validated by LC-MS/MS performed with Quest Diagnostics, afford better results. The samples in the present study were referred to Quest Diagnostics for validation. Due to the incongruent measurements obtained by the 1st generation kit, and to the fact that Abbott discontinued use of this version, the assays thus performed have been ruled out of the discussion of the measurements obtained.

The statistical analysis showed higher concordance with LC-MS/MS in relation to our earlier work. In the NW group, the Wilcoxon signed-rank test showed that only the results yielded by Centaur were statistically different from those obtained by LC-MS/MS, while in the HW group there were divergences for Immulite and Centaur techniques. According to Bland-Altman analysis, Centaur, Immulite and Cobas presented more than 5 % of measurements outside the agreement limits in the HW group. Regression analysis of the combined data for both groups showed significant correlation coefficients for all the methods compared to LC-MS/MS, with 95 % confidence interval of the slopes including 1, except for Immulite, which implies that the values match those obtained by

LC-MS/MS. Still, the Spearman correlation coefficient revealed that none of the methods used matched LC-MS/MS in the NW group, while all of them matched LC-MS/MS within the HW group.

The centrality of dependable serum T determination relates to the fact that T level is a good marker in studying a range of medical conditions. Numerous papers have reported hirsutism to be the clinical manifestation of various disorders. Azziz et al[19] studied 1000 hirsute female patients and described the following pathological conditions and their associated frequencies: androgen-secreting neoplasm: 0.23 %; classical adrenal hyperplasia: 0.69 %; nonclassical adrenal hyperplasia: 2.06 %; hyperandrogenism-insulin-resistance and acantosis nigricans (HAIR-AN): 3.78 %; Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS): 82.02 %; hyperandrogenism-hirsutism/ ovulatory dysfunction: 6.75 %; idiopathic hirsutism: 4.47 %. PCOS is clearly the highest incidence condition among female patients with hirsutism and one for which, as for idiopathic hirsutism, defining biochemical and clinical hyperandrogenism, high serum DHEA-S and/or T, Tbio, or free T and increased Ferriman-Gallwey score respectively, take on crucial diagnostic value. Even though androgen assessment proves important for the former conditions too, clinical features other than hirsutism, along with further lab tests and imaging, are relevant tools in accurately diagnosing them.

Idiopathic hirsutism has been reported for women with clinical hirsutism and normal androgen levels, with no menstrual dysfunction and with progesterone levels in the luteal phase compatible with ovulatory cycles[20]. Obtaining accurate T/ free T and DHEA-S measurements is then critical for diagnosis. Non-validated techniques resulting in wrongly increased values (false positives) would turn diagnosis of idiopathic hirsutism into hyperandrogenism-hirsutism/ ovulatory dysfunction, which would ultimately involve a different prognosis and treatment.

Given that hair growth and characteristics are androgen-dependent, normal-androgen-level hirsutism has not yet been conclusively established. Based on experimental studies, various theories have been put forward, including:

1. The hair follicle produces several factors, among others: epidermal growth factor (EGF); platelet derived growth factor (PDGF); nerve growth factor (NGF); bone morphologic protein (BMP); vascular endothelial growth factor (VEGF); fibroblast growth factor (FGF); tissue growth factor-α (TGF-α) and insulin-like growth factor type 1 (IGF-1). The latter increases the expression of 5-alpha reductase with normal androgen levels[21]. Higher in-situ levels of IGF-1 could possibly increase androgenic activity in the hair follicle.
2. It has been posited that with normal androgen levels, interleukin 6 (IL 6) and tissue growth factor beta (TGF-beta) mediated by their membrane receptors, could induce androgen-receptor phosphorylation and thus trigger an androgen response[22].
3. It has been experimentally demonstrated that while peptide-receptor antagonists associated to the parathormone (R-PTHrP) cause hair loss, antagonists produce a counter effect[23].
4. It has been demonstrated that contraction in the number of androgen receptor exon 1 CAG repeat polymorphisms induces androgen action with normal circulating androgen levels due to a mechanism yet to be fully elucidated[24].

As for PCOS, the Rotterdam expert conference held in 2003 arrived at a consensus on the diagnostic criteria to be followed. The conclusions drawn were published in 20042[5].

The patient should meet at least two of the following three criteria:

1. Oligo- or anovulation
2. Clinical and/or biochemical hyperandrogenism
3. Polycystic ovaries

Criteria 1and 2 or 2 and 3 combined could happen without hirsutism and normal DHEA-S levels in some patients. In such cases, T testing proves crucial. The presence of false negatives in such a determination would lead to PCOS underdiagnosis, and therefore to the possible ensuing metabolic consequences for the patients involved.

The Androgen Excess Society (AES) position statement regards PCOS as an ovarian dysfunction-associated hyperandrogenism syndrome[26], the primary condition being hyperandrogenism, both clinical (hirsutism, acne, alopecia) and/or biochemical (hyperandrogenemia), including one or both of the following features:

1. Ovarian dysfunction: a) oligo-anovulation: cycles lasting under 27 days or over 34 days; b) oligoovulation: cycles lasting between 27 and 34 days with P4 levels < 4 ng/ml.
2. Polycystic ovary imaging (12 or more follicles 2 to 9 mm in diameter in one or both ovaries and/ or increased ovary volume (> 10ml).

AES guidelines again demonstrate the relevance of accurately determining androgen levels in order to characterize possible PCOS phenotypes, particularly among patients whose condition does not involve hirsutism.

Both for idiopathic hirsutism and for PCOS, associated diseases that could present excess androgens should be ruled out. These include: thyroid dysfunction, hyperprolactinemia, nonclassical adrenal hyperplasia (CYP21), Cushing Syndrome, androgen-secreting neoplasms, hyperandrogenism, insulin-resistance and acantosis nigricans (HAIR-AN).

From the qualitative point of view, the current study yielded significant differences compared to our earlier work2. Only four of the methods resulted in false positives, that is to say, increased T values in the two hirsute patients with normal serum T levels by LC-MS/MS. No false positives were found in the NW group except for Centaur methodology.

However, in quantitative terms, and particularly in the NW group, the methods employed –all of them currently used locally- showed substantial differences in resulting values compared against those of LC-MS/MS.

In order to perform measurements that could be easily performed with the commercially available kits either by manual or automated procedures, Tiel Groenetege and colleagues[27] assayed measurements from the serum extracted in ether and resuspended in the matrix for various techniques compared to LC-MS/MS and found a fair amount of matching to the gold standard method.

In this study we performed a duplicated ether extract sample for each aliquot in the NW group. One of the aliquots was resuspended in a phosphate buffer solution. Each participating lab was sent the buffer-suspended sample and the duplicate dry extract to be later resuspended in the assay matrices. None of the reported measurements altered the differences recorded by LC-MS/MSwith either of the two protocols, except for 2nd generation Architect, for which the ether extract was resuspended in the solvent supplied by Abbott for T testing (these measurements are not shown in this paper)

At present, researchers insist on the need to employ LC-MS/MS-validated methods so as to accurately assess circulating T levels within groups with serum T levels close to the quantification limits (lower threshold), such as women, children hypogonadal men and aged men.

The issue has been addressed in a number of other studies reported in the literature, which are outlined as follows:

1) T results from two labs using two LC-MS/MS-validated methods were compared to a RIA[28];
2) Thirteen steroids were tested simultaneously by LC-MS/MS and RIA in women with PCOS[29];
3) Serum T and estradiol measurements were compared in aged men by using an in-house method of gas chromatography tandem mass spectrometry and chemoluminescence[30];
4) Pediatric and adult reference intervals were defined by LC-MS/MS and by comparison with immunological methods[31] as well as in hipogonadal men with hypogonadotrophic hypogonadism and panhypopituitarism[32].

In line with the conclusions presented in this paper, the findings reported in the studies above generally seem to demonstrate that some of the methods currently used would yield clinically satisfactory results.

From a statistical point of view, though, establishing the most efficient statistical methodology to determine acceptability of a given technology turns out to be highly complex matter. Various methods employed in this study (non-parametric paired-sample Wilcoxon, Pearson's correlation coefficient, Bland-Altman and Weighted Deming regression) failed to yield similar differences by reference to LC-MS/MS for certain methods. This lack of consistency on defining acceptability for some methodologies prevents us from drawing any definitive conclusions as regards which statistical methods should be employed so as to be able to validate serum T measurement in hirsute women.

The Centers for Disease Control and Prevention's Hormone Standardization Project (CDC-HoSt Program) set out to standardize serum T testing with a view to improving on diagnosis and preventing T- associated disorders. (For further information contact them at standardization@cdc.gov or visit their official website http://www.cdc.gov/labstandards).

It would be most desirable for every lab to comply with the recommendations and requirements laid down by CDC allowing routinely used methodology to be approved, and thus be able to certify the procedure under review if it meets the ± 6.4 mean bias performance criterion compared to the method of reference. Now, since this condi-

tion is not easy to fulfill, we have had to adopt the CDC criterion and tried to validate the measurements obtained by the various methods in each lab respectively on the basis of the measurements obtained from twin serum samples from hirsute women tested by LC-MS/MS at Quest Diagnostics and validated at CDC in May 2012 and revalidated in 2013 and 2014.

Table 6 shows the mean bias percentages for each lab by reference to LxC-MS/MS. As can be seen, two of the techniques reviewed, 2nd generation Architect and Cobas, satisfactorily passed the validation test. Still, from the three labs using 2nd generation Architect, one failed the meet the validation requirement, as did another two out of the four employing Cobas.

The foregoing demonstrates the variability of inter-lab results, which could possibly be due to divergences between the different commercial kit batches used by the various labs, to method calibration, or to instrument-inherent factors. This is particularly relevant, given that upon certification of the method CDC claims that it is both the supplier's and the participant's responsibility to ensure that the results remain consistent during the one-year period when validity holds.

In conclusion, the results obtained demonstrate that serum T measurements performed with the latest kits in normal women or hirsute women differed substantially from the results obtained locally in an earlier study with methods manufactured by the same suppliers.

The most significant improvements, regardless of statistical analyses, were as follows:

1) All serum T measurements by LC-MS/MS in the NW group fell within the normal range in all cases. Within this group, all the values reported by every lab were also normal, that is to say, there were no false positives, which cancelled the possibility of overdiagnosing clinical hyperandrogenism.
2) As regards the measurements by LC-MS/MS in hirsute women, whenever increased T values were obtained, none of the cases reported by the participating labs included normal values, that is to say, no false negative were reported, which cancelled underdiagnosis of hyperandrogenism.
3) For the two hirsute women with normal serum T levels (by LC-MS/MS), only four of the methods yielded values with higher T levels, in other words, false positives, which induced overdiagnosis /misdiagnosis of hyperandrogenism.

Our next study will be aimed at a larger number of cases in both groups. In the HW group, it will set out to assess T incidence in the various conditions and disorders for which hirsutism is a clinical manifestation as well as T significance in characterizing some of the disease phenotypes, particularly PCOS. Over and above, we expect to continue to be engaged in a number of private and public educational pursuits and support activities, working alongside national and international agencies, with a view to insisting that pharmaceutical companies keep on improving their commercial test kits, as some commercial labs have already done. In this way, clinical biochemistry labs will be able to enhance the reliability of their reports on serum T values.

Acknowledgments: The authors thank Esperanza Ruiz for support with the statistical analyses of our data and Ana Moldero for manuscript preparation.

REFERENCES

1. **Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H**. Position Statement: Utility, limitations and pitfalls in measuring testosterone; An Endocrine Society position statement. J Clin Endocrinol Metab 92:405-413, 2007
2. **Scaglia HE, Aquilano DR, Buccini G, Chichizola C, Corazza N, Corthein C, Fuillerat S, Guevel L, Ibañez G, Lacoste E, Mohr A, Nosetto S, Orsi M, Piaggio R, Riesco O, Sandoz S, Scaglia J, Viola AM, Wolfthal D, Zylbersztein CC.** Quantification of testosterone (T) by 8 immunoassay and by liquid chromatography-tandem mas spectrometry (LC- MS/MS) in normal and hirsute women. A multicentric study. Rev Argent Endocrinol Metab, 50:3-18; 2013
3. **Boots L R, Potter S, Potter D, Azziz R** Measurement of total serum testosterone levels using commercially available kits: high degree of between- kit variability. Fert Steril 69:286-292, 1998
4. **Taieb J, Mathian B, Millot F, Patricot M-C, Mathieb E, Queyrel N, Lacroix I, Somma-Delpero C, Boudou P.** Testosterone measurement by 10 immunoassay and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women and children. Clin Chem 49:1381-1395, 2003.
5. **Fitzgerald RL, Herold DA.** Serum total testosterone, immunoassay comnpared with negative chemical ionization gas chromatography. Clin Chem 42:749-755, 1996
6. **Grant RP, Cameron C, Mackensie-McMurter S.** Generic serial and parallel on-line direct-injection using turbulent flow liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spetrom 16:1785-1792, 2002
7. **Vesper HW, Botelho JC.** Standardization of testosterone measurements in humans. J Steroid Bioch Mol Biology 121:513-519, 2010

8. **Vesper HW, Thienpont LM.** Traceability in laboratory medicine. Clin Chem 55:1067-1075, 2009
9. **Botelho JC, Shacklady C, Razdan R Wesper HW.** Impact of sample preparation procedures of testosterone measurement by isotopic-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem 54 Abstract 122, 2008
10. **Thienpont LM, Van Uytfanghe AL. Blincko S, Ramsay CS,Xie H, Doss RC, Keevil BG, Owen LJ, Rockwood AI, Kushnir MM, Chun KY, Chandler HP, Field PM, Sluss PM.** State-of-the-art of serum testosterone measurement by isotopic-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem 54:1290-1297, 2008
11. **Vesper HW, Bhasin S, Wang C, Tai SS, Dodge LA, Sinh RJ, Nelson J, Ohorodnik S, Clarke NJ, Parker Jr CR, Razdan R, Monsell E A, Myers GL.** Interlaboratory comparison study of serum total testosterone measurements performed by mass spectrometry methods. Steroids 74:498-503, 2009
12. **Ferriman D, Gallwey J.D**. Clinical assessment of body hair growth in women. J Clin Endocrinol Metab 21:1440-1447, 1961
13. **Bland J. M, Altman DG.** Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1:307-310, 1986
14. **Linnet K.** Necessary sample size for method comparison studies based on regression analysis. Clin Chem. 45:882 - 894, 1999
15. **Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W.** Position statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: An Androgen Excess Society guideline. J Clin Endocrinol Metab 91:4237-4245, 2006
16. **Dunn JK, Nisula BC y Roadbard D.** Transport of steroids hormones. Binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid- binding globulin in human plasma. J Clin Endocrinol Metab 53:58-68, 1981
17. **Sodergárd R, Backstroom T, Schnbhan V, Cartensen H.** Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol 17 beta to human plasma protein at body temperature. J Steroid Biochem 16:801-810, 1982
18. **Riesco, OF; Aquilano, DR y Scaglia, HE**. Descripción de un método simple para la determinación de Testosterona libre y biodisponible. Evaluación crítica y aplicaciones en la clínica endocrinológica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana vol. XXXVI, No 1, 5-26,2002
19. **Azziz R, Sanchez LA, Knochenhauer ES, Moran C,Lazenby J, Stephens K, Taylor K, Boots LR**. Androgen Excess in Women: Experience with over 1000 consecutive patients. J Clin Endocrinol Metab 89:453-462, 2004
20. **Azzis, R, Carmina E, Sawaya E.** Idiopathic Hirsutism. Endocrine Reviews 21(4):347-362, 2000.
21. **Thiboutot DM,** Normal physiology of the pilosebaceus unit. in Azzizz R, Nestler JE,and Dewailly D. Androgen excess disorders in women (eds). Lippincott – Raven. New York. 1997, pag 103-115
22. **Heinlein CA, Chang C**. Androgen receptor (AR) Coregulator: An overview. Endocrine Reviews 23:175-201, 2002 (Publicado on line en 2013)
23. **Holick MF.** PTHrp in alopecia. Endocrine Society - 83rd annual meeting Abst: S29.
24. **Scaglia, J.** Receptor de los andrógenos, gen que lo codifica. Mecanismo de acción y patologías asociadas. Revista Argentina de Andrología 17:34-41, 2008
25. **Chang J; R Azziz R, Legro R, Dewailly D, Franks S, Fausen B, Balen B.** (Scientific Committee) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Scientific Committee: Fert Steril 81:19-25, 2004
26. **Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF.** The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. Fertil Steril: 91:456-458, 2009.
27. **Tiel Groenestege, WM, Bui HN, ten Kate J , Menheere PPCA, Oosterhuis WP, VaderHL, Heijboer AC,Marcel J.W. Janssen MJW**. Accuracy of First and Second Generation Testosterone Assays and Improvement through Sample Extraction. *Clinical Chemistry* 2012; v. 58,p.1154-1156 (to the editor) Published April 26, 2012
28. **Legro RS, Schlaff WD, Diamond MP, Coutifaris C, Casson PR, Brzyski RG, Christman GM, Trussell JC, Krawetz SA, Snyder PJ, Ohl D, Carson SA, Steinkampf MP, Carr BR, McGovem PG, Cataldo NA, Gosman GG, Nestler JE, Myrers ER, Santoro, Eisenberg E, Zhang M, Zhang H.** for Reproductive Medicina Network. Total testosterone assay in women with Polycystic Ovary Syndrome. Precision and correlation with hirsutism. J Clin Endocrinol Metab 95:5305-5313, 2012. Published on line 2/jul 2013
29. **Keeffe CC. Goldman MM, Zhang K, Clarke N, Reitz RE, Welt CK.** Simultaneous measurement of thirteen steroid hormones in women with Polycystic Ovary Syndrome and Control women using liquid Chromatography-tandem mass spectrometry. PloSOne 8:9 (4) e 93805, 2014. Published on line doi:10.1371/journal.pone 0093805 e collection, 2014
30. **Huhtaniemi IT, Tajar A, Lee DM, O`Neill TW, Finn JD, Bartfal G, Boonen S, Casanueva FF, Giwercman A, Han TS, Kula K, Labrie F, Lean MEJ, Punab M, Silman AJ, Vanderschueren D, Forti G, Wu FCW,** EMAS group. Comparison of serum testosterone and estradiol measurements in 3174 European men using platform immunoassay and mass spectrometry; relevance for the diagnostics in aging men. European Journal of Endocrinology 166:983-991, 2012
31. **Kushnir MM, Blamires T, Rockwood AL, Roberts WL, Yue B, Erdogan E, Bunker AM, Wayne Meikle A.** Chromatography-tandem mass spectrometry assay for androstenedione, dehydroepiandrosterone and testosterone with pediatric and adult reference intervals. Clin Chem 56:1138-1147, 2010
32. **Giton F, Trabado S, Maione L, Sarfati J, Le Bouv Y, Brailly-Tabard S, Fiet J, Young J.** Sex steroids, precursors and metabolites deficiencies in men with isolated hypogonadotipic hypogonadism and panhypopituitarism: a GCMS-based comparative study. J Clin Endocrinol Metab. 2015 Feb;100(2):E292-6. doi: 10.1210/jc.2014-2658. Epub 2014 Nov 13.

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Copyright ® 2015 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Vol 52 • Nº 3

REVISIÓN

Oftalmopatía de Graves y tratamiento con I^{131}

Graves´ Ophthalmopathy and Radioiodine Treatment

Delfino L, Gauna A, Yampey J.

Carrera de Especialista en Endocrinología de la Facultad de Medicina de la UBA, Unidad Académica Ramos Mejía, CABA, Argentina
Servicio de Endocrinología, Hospital J.M. Ramos Mejía

RESUMEN

La oftalmopatía de Graves (OG) es un desorden autoinmune que representa la manifestación extratiroidea más frecuente de la Enfermedad de Graves. Se describen múltiples factores que pueden influir en el desarrollo/ progresión de la enfermedad, entre ellos el tratamiento con I^{131}. El ***objetivo*** de esta monografía es analizar la bibliografía existente sobre la relación entre OG y tratamiento con I131, teniendo en cuenta su fisiopatología así como los factores de riesgo asociados y su profilaxis. **Argent Endocrinol Metab 52:153-162, 2015**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés

Palabras clave: Oftalmopatía de Graves, Orbitopatía distiroidea, Radioyodo

ABSTRACT

Graves´ ophthalmopathy (GO) is an autoimmune disorder representing the most common extrathyroidal manifestation of Graves' disease. Multiple factors can influence the development / progression of the disease, including treatment with ^{131}I. The aim of this paper is to analyze the existing literature on the relationship between OG and treatment with I^{131}, considering the pathophysiology and associated risk factors and prophylaxis. **Argent Endocrinol Metab 52:153-162, 2015**

No financial conflicts of interest exist.

Keywords: Ophthalmopathy, Graves, Dysthyroid Ophthalmopathy, Radioiodine

1. INTRODUCCIÓN

La oftalmopatía de Graves (OG) es un desorden autoinmune que representa la manifestación extratiroidea más frecuente de la Enfermedad de Graves (EG). La prevalencia clínica es del 50 % y la subclínica, diagnosticada por ecografía o tomografía, del 90 %[1]. Produce un marcado deterioro de la calidad de vida, con un grave impacto sobre las actividades cotidianas del paciente, afectándolo en el ámbito social y laboral.

La OG resulta de un complejo y aún poco comprendido interjuego entre factores endógenos y ambientales[2]. El tabaquismo, la disfunción tiroidea, el nivel de anticuerpos antireceptor de TSH (TRAb) y el tratamiento con yodo 131 (I^{131})[1], probablemente jueguen un rol principal como factores ambientales y deben ser adecuadamente controlados para evitar el desarrollo o la progresión de la OG[3]. El tratamiento con I^{131} es un punto conflictivo y numerosos estudios han sugerido un incremento del riesgo de progresión de la oftalmopatía, luego del

Recibido: 04-12-2014 Aceptado: 16-03-2015

Correspondencia: Laura Carolina Delfino- Ramón Falcón 1575 4°B
Mail: lauracdelfino@yahooo.com.ar - Teléfono: 1558184064/4633-9075

tratamiento con radioyodo. El análisis sistemático resulta dificultoso por el grado de heterogeneidad en los parámetros utilizados para evaluar la oftalmopatía, la inclusión o no del hábito tabáquico o la existencia de hipotiroidismo no tratado en forma precoz en los diferentes trabajos. El ***objetivo*** de esta monografía es analizar la bibliografía existente sobre la relación entre OG y tratamiento con I^{131}, teniendo en cuenta su fisiopatología así como los factores de riesgo asociados y su profilaxis.

2. IMPACTO DEL TRATAMIENTO CON I^{131} SOBRE LA OG

2.1. Comparación entre los diferentes tratamientos

La terapia con I^{131} se ha utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Graves por más de seis décadas, pero la asociación entre I^{131} y el desarrollo o empeoramiento de la OG sigue sin estar totalmente aclarada. Hasta 1990 todos los trabajos que evaluaban el tratamiento del hipertiroidismo (drogas antitiroideas, cirugía e I^{131}) y el desarrollo de OG fueron retrospectivos, con diferentes metodologías que arrojaban resultados contradictorios. (Tabla I)

En 1992 Tallstedt realizó el primer trabajo prospectivo controlado y randomizado (RCT) donde comparó la aparición de OG o el deterioro de la misma, en pacientes tratados con drogas antitiroideas, cirugía o I^{131}. Sus resultados avalan un mayor riesgo de desarrollo o deterioro de la OG en aquellos pacientes tratados con I^{131} en comparación con los que recibieron los otros tratamientos[14] En 1992 Vázquez-Chávez encontró resultados similares entre el tratamiento con I^{131} y cirugía pero no resultaron estadísticamente significativos[15]. Bartalena en 1998, realizó la comparación entre los tres tratamientos más un cuarto grupo tratado con I^{131} y prednisona, concluyendo que el deterioro de la OG suele ser transitorio y puede ser prevenido con la administración de corticoides[16]. A diferencia de lo antedicho, un estudio realizado en pacientes con OG mínimamente activa concluyó que el tratamiento con yodo radiactivo no se asocia con el deterioro de la OG cuando el hipotiroidismo posterior es evitado[17]. Un estudio prospectivo, no comparativo publicado por Sisson en 2008 mostró que, luego del tratamiento con yodo radiactivo, ningún cambio sustancial se evidenció en las manifestaciones de los elementos del Score de Actividad Clínica, a excepción de un modesto aumento del exoftalmos en el 39 % de los pacientes[18].

Acharya en 2008 analizó una revisión de los trabajos randomizados controlados (RCT) existentes, cuyas conclusiones se exponen en la tabla II[19].

Posteriormente a este metaanálisis, Traisk realizó un nuevo RCT en 2009 donde comparó radioyodo con metimazol (Fig. 1). Llamativamente en los pacientes con OG preexistente, el curso de la oftalmopatía no fue significativamente afectado por ninguno de los tratamientos. A diferencia de esto, el desarrollo de OG de *novo* fue significativamente más frecuente en el grupo tratado con I^{131}[20].

2.2, Mecanismos postulados por los cuales el tratamiento con radioyodo desarrolla o deteriora la OG

Después de una sola administración de I^{131}, los efectos biológicos incluyen necrosis y replicación alterada de las células foliculares no destruidas, atrofia, fibrosis y una respuesta inflamatoria cró-

TABLA I.– Resumen de las primeras publicaciones sobre la relación entre el tratamiento del hipertiroidismo y la evolución de la OG

Autor	Resultados
Arronow (1965)[4]	Sin cambios en OG con drogas antitiroideas (DAT)
Hamilton (1967)[5]	Sin diferencia en OG entre cirugía y I^{131}
Kriss (1967)[6]	Mayor OG con I^{131}
Barbosa (1972)[7]	Mayor OG con I^{131}vs. cirugía o DAT
Solem (1979)[8]	Sin cambios en OG con DAT
Gwinup (1982)[9]	Mayor exoftalmos con DAT pero no con otros tratamientos
Calissendorff (1989)[10]	Sin diferencia entre DAT, cirugía subtotal o bajas dosis de I^{131}
Vestergaard (1989)[11]	Agravamiento OG con I^{131}
Sridama (1989)[12]	Sin diferencia entre DAT, cirugía subtotal o bajas dosis de I^{131}
Barth (1991)[13]	Deterioro de la OG con I^{131}

TABLA II.- Comparación entre el tratamiento con radioyodo versus drogas antitiroideas y tiroidectomía

I^{131} VS. DAT	I^{131} vs. Tiroidectomía
La oftalmopatía se desarrolló en 36/189 pacientes que recibieron I^{131} en comparación con 8/186 pacientes que recibieron DAT. El tratamiento con I^{131} se asoció con un mayor riesgo de aparición o empeoramiento oftalmopatía en comparación con DAT. (RR 4•23; 95 % CI 2•04–8•77) El tratamiento con I^{131} se asoció con un riesgo incrementado de oftalmopatía severa (definida por la necesidad de inmunosupresión, radioterapia orbitaria y/o descompresión) (RR 4•35; 95 % CI 1•28–14•73)	La oftalmopatía se desarrollado o avanzó en 22/59 en el grupo con I^{131}, en comparación con 13/57 que se sometieron a tiroidectomía. El tratamiento con radioyodo se asoció con un riesgo ligeramente mayor de oftalmopatía en comparación con la cirugía, aunque estadísticamente no fue significativa. (RR 1•59; 95 % CI 0•89-2•81)

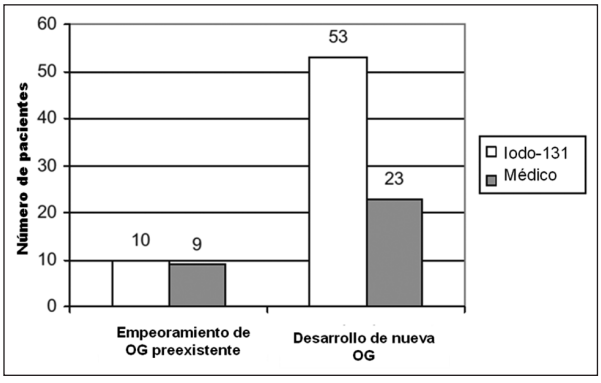


Figura 1. Número de pacientes con deterioro de OG preexistente (45 % en el grupo I^{131} y 47 % en el grupo de tratamiento médico) y desarrollo de OG nueva (38 % en el grupo I^{131} y 18 % en el grupo de tratamiento médico) en todo momento durante el seguimiento (Adaptado de Traisk 2009)[20]

nica, que en última instancia, resultará en insuficiencia tiroidea permanente. Se ha descripto que después de una lesión de la glándula tiroides, se produce una liberación de antígenos, dando lugar a un aumento de la producción de autoanticuerpos: TRAb, antitiroglobulina, y antitiroperoxidasa. El tratamiento con yodo radiactivo también es seguido por cambios en la autoinmunidad tiroidea con un aumento transitorio de los TRAb[21,22]. El aumento de los TRAb después del radioyodo también se observó en los ensayos clínicos. En un estudio prospectivo en pacientes con diagnóstico reciente de enfermedad de Graves asignados al azar a tratamiento médico, cirugía, o terapia con I^{131} se evaluó la curva de TRAb durante 5 años. La terapia médica y quirúrgica fue seguida de una disminución gradual de TRAb y negativización en el 70 %-80 % de los pacientes después de 18 meses. En contraste, un aumento considerable de TRAb se observó después de la terapia con radioyodo y se mantuvo elevado a 5 años de seguimiento, con un valor máximo a los 3 meses (Fig. 2). La desaparición de los TRAb fue significativamente menor en el grupo que recibió I^{131} vs. los otros tratamientos ($p < 0{,}003$)[23]. (Fig. 2)

El tratamiento con yodo radioactivo podría empeorar la OG no solo por incrementar la producción de autoanticuerpos, sino también a través de la inducción de hipotiroidismo. Así, la estimulación de las células a través del TSH-R ya sea por niveles elevados de TSH (debido a hipotiroidismo) o por un aumento de TRAb (debido al I^{131}) podría resultar en una señal patógena que conduce a una exacerbación de la enfermedad ocular. Es más, tanto la TSH como los TRAb inducen la expresión de HLA-DR por las células de la tiroides, así como aumentan la síntesis y expresión de la tiroperoxidasa en los tirocitos[24].

2.3.Factores de riesgo asociados al deterioro de la OG secundaria al tratamiento con I^{131}

La aparición o la progresión de la OG luego del tratamiento con I^{131} ocurre en un porcentaje bajo de pacientes, por lo que resulta de interés poder identificarlos. Se describen varios factores de riesgo[25]. (Tabla III)

Tabaquismo: Fumar es un factor de riesgo establecido que se relaciona con el desarrollo de la OG, progresión a formas graves y reducción en la eficacia de los tratamientos médicos[2]. Existe asociación entre el hábito de fumar y el desarrollo de OG después del tratamiento con I^{131}. Aunque el

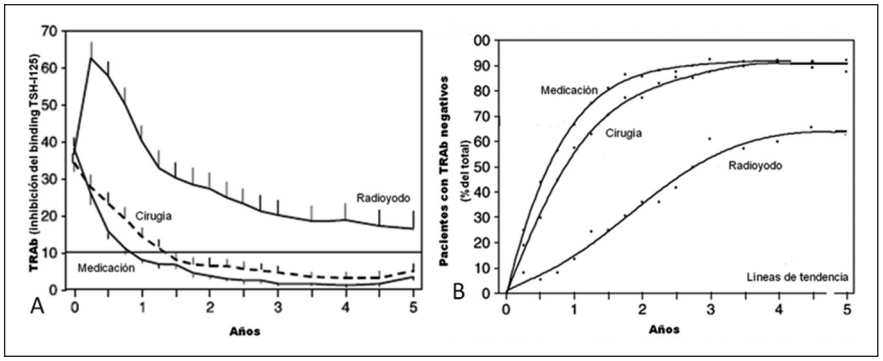


Figura 2. A) Variaciones en los niveles de TRAb luego del radioyodo, cirugía o tratamiento médico. B) Fracción de los pacientes con TRAb negativos luego del tratamiento con radioyodo, cirugía o tratamiento médico. (Adaptado de Laurberg 2008)[23]

TABLA 3. Factores de riesgo personalizados relacionados con la enfermedad de Graves en pacientes tratados con radioyodo (Adaptado de Ponto 2010)[25]

Condición	Factor de Riesgo
OG	Antecedente de tabaquismo
	Altos niveles de TRAb
	Altos niveles de T3 pretratamiento
	Hipotiroidismo prolongado luego del I^{131}
	Edad (mayores 60 años)
	Sexo masculino
	Genética

mecanismo exacto es desconocido, podría estar relacionado con efectos directos irritativos y/o inmunes[26]. Cawood en 2007 sugirió que el tabaquismo puede producir este efecto mediante el aumento de la adipogénesis en la órbita, y actuar de forma sinérgica con la IL-1 en este sitio[27]. Un estudio reciente demostró que el tabaquismo genera la sobreexpresión de genes tempranos relacionados con la adipogénesis y la inflamación[28]. Un metaanálisis realizado por Vestergaard, donde se estudiaron los trastornos tiroideos en fumadores, mostró que la odds ratio (OR) para alguna vez haber fumado y OG fue de 4,40 (IC 95 % 2,88 -6,73), siendo superior a la OR de fumar con enfermedad de Graves (1,90, IC 95 % 1,40 -2,55) en seis estudios[29]. En la revisión de Acharya, tres RCT mencionaron una alta prevalencia de tabaquismo (40-60 %) y dos describieron una asociación positiva con el tabaquismo y la OG, siendo estadísticamente significativa solo en un estudio[19]. El trabajo de Traisk de 2009, mostró que los fumadores tenían un mayor riesgo de progresión o desarrollo de OG en forma independiente de la modalidad de tratamiento antitiroideo, pero los fumadores tratados con I^{131} tenían el mayor riesgo[20].

Altos niveles de TRAb: Altos niveles de TRAb representan un factor de riesgo independiente para el desarrollo de OG más severa[30]. A pesar de esto, la relación entre la concentración de TRAb y progresión de la OG después de la administración de I^{131} aún no se ha establecido con certeza. La administración de yodo radioactivo está seguida por un aumento en los niveles séricos de TRAb, pero en la revisión de Achayra ningún RCT halló correlación entre los niveles de TRAb y la progresión de la OG[19]. Sin embargo, en una revisión realizada por el grupo de trabajo de Bartalena en 2008, los autores sugieren tener en cuenta los niveles de TRAb como factor de riesgo, y a pesar de no poder determinar valores de corte, ellos sugieren en base a que, resultados de TRAb > 10 UI/l después de 6 meses o > 7,5 UI/l después de 12 meses de tratamiento con drogas antitiroideas se asociaron con mayor frecuencia de recaída del hipertiroidismo, valores similares o algo menores pueden representar un mayor riesgo para la progresión de la OG luego del tratamiento con I^{131}[31].

Niveles elevados de T3 pretratamiento: En 1992 Tallstedt evidenció que el desarrollo o deterioro de la OG aumentaba a medida que se elevaban las concentraciones de T3 pretratamiento[26]. Resultados similares fueron reportados por Törring en 1996, siendo el riesgo aún mayor en los pacientes tratados con I^{131}[32]. En contraste, Kung no encontró ninguna correlación entre niveles de séricos de T3 o T4 con la oftalmopatía[33].

Hipotiroidismo luego del tratamiento con radioyodo: En el RCT de Tallstedt que comparó la OG luego de los diferentes tratamientos, los pacientes tratados con cirugía y drogas antitiroideas eran tratados desde el comienzo con levotiroxina a diferencia del grupo de I^{131} que era reemplazado

solo al constatarse hipotiroidismo bioquímico. Los autores postularon la hipótesis que el hipotiroidismo transitorio podría ser la causa de este mayor riesgo de presentar o deteriorar la OG, aunque no fue estadísticamente significativo[26]. En 1994 este mismo grupo de trabajo publicó un trabajo donde comparó en forma retrospectiva el desarrollo de OG en pacientes tratados con I^{131} tratados en forma temprana y sistemática con levotiroxina vs. reemplazo al constatarse el hipotiroidismo, presentando este último grupo un mayor riesgo de OG[34]. Asimismo otro RCT en 1994 encontró que el desarrollo de hipotiroidismo se asoció con mayor riesgo de aparición o exacerbación de OG[33]. Un estudio observacional de Perros muestra que el deterioro de la OG en pacientes con enfermedad leve podría ser evitado por la administración temprana de T4 luego del I^{131}[17]. Aún no se cuenta con RCT que comparen la suplementación temprana con T4 vs. suplementación de rutina para confirmar estos resultados.

Edad, sexo, etnia y genética: Aunque ningún trabajo ha estudiado la relación específica entre estos factores y la OG luego del tratamiento con I^{131}, esto si fue evaluado en pacientes con OG en general. Existe evidencia que los pacientes mayores de 60 años de edad (sobre todo los varones) con enfermedad de Graves parecen estar en mayor riesgo de desarrollar enfermedad severa en los ojos[35], en contraste a lo que ocurre en la edad pediátrica donde la OG es rara y suele ser leve[36]. Un trabajo retrospectivo realizado por Vannucchi, aunque no fue diseñado específicamente para estudiar esta relación, encontró que la activación de la OG luego del tratamiento con I^{131} era más prevalente en hombres ($p < 0,02$) y añosos ($p = 0,04$)[37]. Así mismo, el origen étnico parece de importancia ya que los asiáticos en comparación con los caucásicos tienen una probabilidad mucho menor de desarrollar OG[38]. Si estas diferencias se relacionan con los antecedentes genéticos, variaciones en la exposición del medio ambiente, tales como el tabaquismo y la ingesta de yodo, o divergencia anatómica es aún incierto[39].

2.4. ¿Cuándo ocurre la aparición o el deterioro de la OG luego de la dosis de I^{131}?

En cuatro estudios aleatorizados se observó que la incidencia máxima de OG después del tratamiento con radioyodo fue a los 6 meses. Sin embargo, la OG desarrolló en cualquier momento entre 1 a 24 meses después del I^{131}[19].

3. ROL DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA PREVENCIÓN DEL DETERIORO DE LA OG LUEGO DEL TRATAMIENTO CON I^{131}

3.1. Efectividad de la profilaxis con corticoides

Numerosos estudios prospectivos han reportado un efecto beneficioso de la profilaxis con esteroides para la OG en los pacientes que recibieron tratamiento con I^{131}.

El primer RCT que evaluó la profilaxis con corticoides fue realizado en 1989, se randomizaron los pacientes en dos grupos: Grupo 1: solo I^{131} y Grupo 2: I^{131} + prednisona vía oral (0,4-0,5 mg/kg/d comenzando 2-3 días luego de la dosis del radioyodo, durante un mes y luego un descenso gradual). Ninguno de los pacientes de ambos grupos desarrollo OG de *novo* luego de la dosis de I^{131}. Entre los pacientes con OG un 56 % agravó su enfermedad (fundamentalmente presentaron los cambios de los tejidos blandos y la función del músculo extraocular) y en el resto no se modificó, a diferencia del grupo 2 donde un 52 % mejoro la OG y en ninguno empeoró. Así, la conclusión del trabajo fue que el tratamiento con corticosteroides sistémicos evita las exacerbaciones de la oftalmopatía de Graves que se producen después de la terapia con yodo radiactivo[40]. En 1998 este mismo grupo de trabajo encontró que el 15 % de los pacientes del tratados solo con I^{131} desarrollaron o deterioraron la OG, ninguno mejoró; a diferencia de lo que ocurrió con el tratamiento con metimazol donde el 2 % de los pacientes con OG previa mejoraron y el 3 % empeoró; y a los que se agregó prednisona al tratamiento con radioyodo donde el 67 % presentaron mejoría y ningún presento progresión[16].

El metaanálisis realizado por Acharya mostró que la profilaxis con prednisolona fue altamente efectiva en la prevención del deterioro de la oftalmopatía en pacientes con enfermedad preexistente. La oftalmopatía empeoró en 29 % pacientes y el 7 % desarrolló OG de novo en los pacientes que recibieron I^{131} sin profilaxis. Ninguno de los pacientes que recibieron GC luego de la dosis deterioro o desarrollo OG con enfermedad ocular preexistente que recibieron I^{131} solo. (RR 0,03, IC 95 % 0,00-0,24- OG preexistente). (RR = 0,09, IC 95 %: 0,00-1,49- sin OG preexistente)[19].

3.2. Dosis de la profilaxis con corticoides

Las dosis óptimas y esquemas para el tratamiento con prednisona no se han definido.

Un estudio retrospectivo de cohortes fue desarrollado en 2010. Estudiaron un grupo de pacientes con OG leve o ausente, asignándolos a tres grupos: sin profilaxis, profilaxis a dosis bajas de prednisona (dosis inicial, 0,16-0,27 mg/kg/d, grupo 1) y profilaxis a dosis más altas (dosis inicial, 0,32-0,56 mg/kg/d, grupo 2). El tratamiento se inició un día luego de la dosis de I^{131} y duró por 6 semanas. El

6 % de los pacientes que no recibieron profilaxis con esteroides desarrollaron OG leve a moderada después del tratamiento con yodo. Ningún paciente del grupo 1 o 2 presentaron progresión de la OG. Los efectos secundarios fueron muy leves e inconstante, aunque más frecuentes en el grupo 2. Ambos grupos mostraron un incremento en peso corporal, el cual fue significativamente mayor en el grupo 2. Las conclusiones de este trabajo fueron que dosis de prednisona menores (aproximadamente 0,2 mg/kg/d) a las previamente descriptas (0,3-0,5 mg/kg/d) por periodos más cortos (6 semanas vs. 3 meses) podrían ser igualmente efectivas con menor impacto sobre el peso corporal[41].

Sin embargo, un estudio retrospectivo realizado con el objetivo de comparar el efecto del tratamiento con I^{131} sobre la OG con y sin profilaxis con esteroides basado en factores de riesgos conocidos y para comparar la efectividad de la profilaxis con corticoides endovenosos (EV) y con corticoides vía oral (VO), encontró que la activación se observó en el 7,2 % de los pacientes sin y en el 33,3 % de los pacientes con profilaxis ($p<0,0001$), con una prevalencia general del 14,6 %. La activación de la OG ocurrió en el 47,6 % de los pacientes tratados con corticoides VO pero en ningún paciente tratado en forma EV ($p<0,0001$). La conclusión de este trabajo fue que la activación de la OG ocurre en aproximadamente el 15 % de pacientes, aún en ausencia de signos clínicos de actividad de la OG y que la profilaxis con corticoides VO no fue efectiva en una alta proporción de los pacientes a diferencia de los corticoides EV[37]. Es importante tener en cuenta que la elección de los diferentes tratamientos fue hecha siguiendo criterios clínicos y no en forma aleatoria lo que puede influenciar en parte los resultados encontrados.

Un metaanálisis realizado en 2014 apoya un enfoque de tres niveles en la profilaxis: Prednisona a dosis estándar es el régimen mejor validado y se debe utilizar en pacientes con OG leve a moderada que tienen alto riesgo de progresión, mientras que dosis bajas se pueden utilizar en pacientes con OG leve, y en pacientes sin orbitopatía preexistente que tienen factores de riesgo y se seleccionan para la profilaxis GC. Los pacientes sin OG preexistente y sin factores de riesgo no deben ser tratados con profilaxis GC[42].

3.3. Profilaxis con corticoides: implicancias y efectos adversos

En un estudio prospectivo donde se evaluó la eficacia de la dosis I^{131} en pacientes tratados con betametasona durante 3 semanas antes y 4 semanas después de la dosis, se evidenció qué corticoide retrasó, pero no eliminó el incremento de TRAb inducido por el radioyodo y que solo el 45 % de los pacientes tratados con betametasona desarrollaron hipotiroidismo vs. 85 % de los pacientes tratados solo con yodo[43]. Por el contrario, en un ensayo aleatorizado de gran tamaño, la prevalencia de hipotiroidismo permanente después del tratamiento con I^{131} fue similar en pacientes tratados solo con yodo (62 %) o con yodo seguido por la cobertura de los glucocorticoides (66 %); y el fracaso del tratamiento (persistencia del hipertiroidismo) fue similar en los dos grupos (14 % y 12 %, respectivamente)[16]; resultados similares fueron reportados en otros estudios[44]. Por lo tanto, los datos disponibles sugieren que la profilaxis con glucocorticoides después del I^{131}, no afecta el resultado del tratamiento con yodo radiactivo para el hipertiroidismo. En consecuencia, ningún aumento de la dosis de yodo es requerido. A la inversa, el tratamiento previo con glucocorticoides puede reducir la eficacia del yodo y, por tanto, debe ser evitado.

En una revisión de los efectos adversos en la profilaxis con esteroides vía oral, no se evidenciaron efectos adversos excepto por hábito cushingoide transitorio reportado en un trabajo, con excepción de una muerte por hemorragia cerebral en un paciente con hipertensión arterial[19]. También se encontró que dosis mayores generaron mayor ganancia de peso, aunque esta se evidenció con todas las dosis[41]. En relación con la profilaxis con corticoides EV, Vanuccchi reportó que los pacientes tratados por esta vía, presentaron efectos adversos como dispepsia, ansiedad, hiperglucemia o hábito cushingoide menos frecuentemente que los que recibieron tratamiento VO[37]. Sin embargo, Bahn en una editorial sugiere que en los pacientes con enfermedad activa de moderada gravedad, al evaluar la relación riesgo-beneficio de los glucocorticoides intravenosos a altas dosis (0,5-1 g) vs. esteroides orales o incluso con la observación cuidadosa y la

reevaluación frecuente; los primeros representan un riesgo alto o inaceptable[45].

4. GUÍAS DE TRATAMIENTO

Dado la limitada información que existe sobre el tema y la heterogeneidad de los trabajos, son pocas las guías de consenso que dan pautas claras sobre algoritmos a seguir:

Según declaración de consenso de la EUGOGO los pocos RCT disponibles sobre los efectos de la terapia con radioyodo en la OG muestran que una proporción definida de los pacientes (aproximadamente el 15 %) desarrollan o deteriorarán la OG dentro de los 6 meses después del tratamiento. En el 5 % de los pacientes, el empeoramiento se mantiene por más de un año y requieren un tratamiento adicional. Este riesgo es eliminado casi por completo, dando un curso corto (3 meses) de los glucocorticoides orales después de la terapia con yodo radioactivo, y evitando el hipotiroidismo. Cursos de menor duración (1-2 meses) podrían ser igualmente efectivos. El riesgo de exacerbación de la OG preexistente es despreciable y la profilaxis con esteroides puede ser evitada en pacientes con enfermedad ocular inactiva, siempre y cuando el hipotiroidismo posterior sea evitado, y otros factores de riesgo para la progresión de la OG, incluyendo el hábito de fumar y altos niveles de anticuerpos contra el receptor de TSH (>7,5 UI/l), estén ausentes[46].

Bartalena en una revisión realizada en 2011[47] sugiere la elección de tratamiento para el hipertiroidismo, según el grado de severidad y actividad de la OG (Fig. 3):

En relación con la profilaxis con esteroides Ponto en su revisión de 2010 sugiere seguir el siguiente algoritmo[25] (Fig. 4):

5. CONCLUSIONES

La información disponible en la actualidad permite estimar que aproximadamente el 15 % de los pacientes tratados con I^{131} pueden presentar un deterioro de su estatus oftalmológico, no existiendo este riesgo en los pacientes tratados con drogas antitiroideas o cirugía. Este efecto secundario del I^{131} puede atribuirse a una liberación masiva de antígenos tiroideos, consecuencia de la destrucción glandular. No obstante el tratamiento con radioyodo sigue siendo uno de los tratamientos de elección en hipertiroidismo porque es una terapéutica de bajo costo, que no requiere de internación de los pacientes, con un control rápido del hipertiroidismo

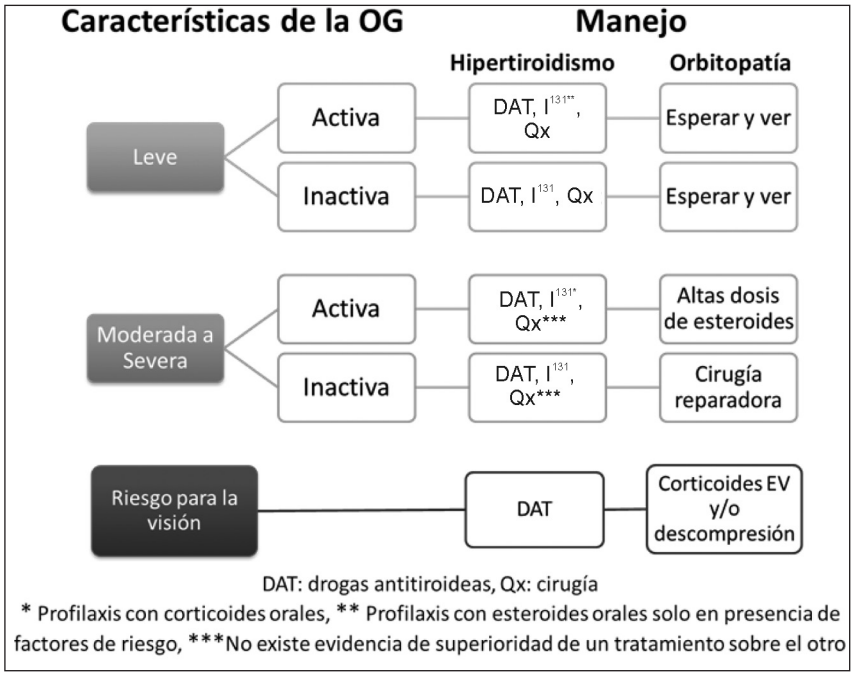


Figura 3. Manejo del hipertiroidismo y la orbitopatía de la enfermedad de Graves en las diferentes presentaciones clínicas. (Adaptado de Bartalena 2011)[47]

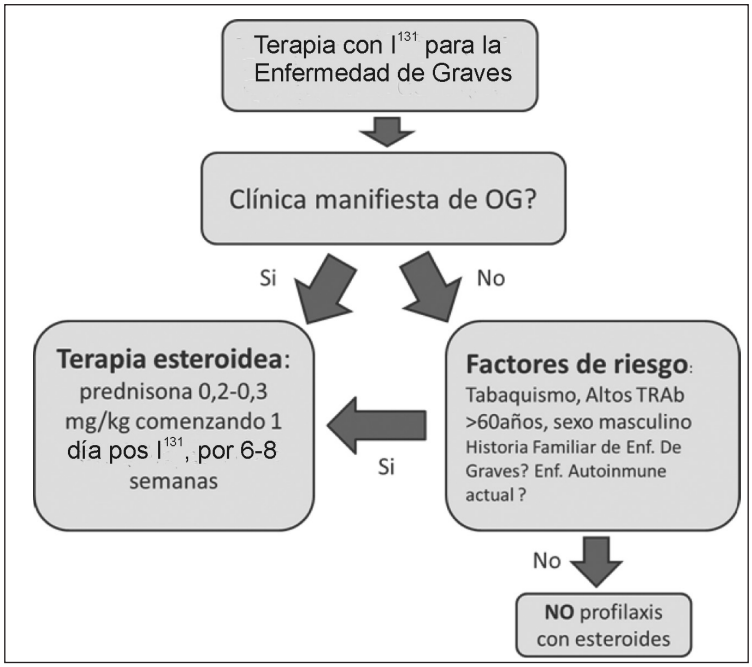


Figura 4. Esteroides para el tratamiento con radioyodo de la Enfermedad de Graves: ¿Cuándo y cómo? (Adaptado de Ponto 2010)[25]

en la mayoría de los casos, sin el riesgo que puede significar la anestesia y la cirugía. Por lo tanto, es fundamental poder discriminar que población es de riesgo oftalmológico para el tratamiento con radioyodo.

Si bien, no hay marcadores ideales para identificar el subgrupo de pacientes que pueden desarrollar/deteriorar la OG, hay evidencias que el tabaquismo, los niveles elevados de TRAb y el mayor nivel sérico de T3 pretratamiento son factores de riesgo. Estos pueden estar en relación con una mayor severidad de la enfermedad autoinmune. Otro factor de riesgo importante para el desarrollo/deterioro de la OG es el hipotiroidismo posterior al tratamiento con radioyodo, por lo cual este debe ser evitado, ya sea con administración temprana de levotiroxina en forma rutinaria (indicado principalmente en aquellos pacientes en los cuales no sea posible un control de laboratorio frecuente) o con el estrecho seguimiento clínico y de hormonas tiroideas séricas para su detección y tratamiento precoz.

Ha sido ampliamente demostrado que el tratamiento con glucocorticoides posteriormente a la dosis de I^{131} evita o por lo menos disminuye el riesgo de OG. Dos puntos de conflicto en este tópico son: 1) ¿La profilaxis debe ser universal?: las últimas guías de tratamiento publicadas, en relación con las evidencias, concuerdan en lo siguiente: el tratamiento profiláctico con corticoides solo debe ser prescripto en los pacientes con factores de riesgo de desarrollo/deterioro de la OG o en aquellos con OG activa moderada a severa, previo análisis de costo-efectividad en relación a los otros tratamientos del hipertiroidismo disponibles. En aquellos pacientes en que la severidad de la OG ponga en riesgo la visión, se debe priorizar el tratamiento de la OG y relegar la terapéutica radical del hipertiroidismo a un segundo plano hasta lograr la estabilización del cuadro. 2) ¿Cuál es la dosis y tiempo de duración de la profilaxis?: el panorama no es tan claro, en relación a este punto, considero acorde a la información actual, que tratamientos cortos a dosis bajas de corticoides, iniciados 24 a 48 h posradioyodo, pueden ser efectivos para la prevención del desarrollo/evolución de la OG. Quiero remarcar la gran importancia clínica de implementar estudios para determinar la dosis mínima de corticoides efectiva y el menor tiempo requerido para la adecuada profilaxis, lo cual implica una reducción en la aparición de afectos adversos.

A pesar de la selección de subgrupos de mayor riesgo y de la correcta indicación de la profilaxis con corticoides, la carencia de marcadores ideales

en la actualidad, implica que seguramente en un muy pequeño número de pacientes no se podrá evitar el desarrollo o deterioro de la OG. Por este motivo y sumado al alto impacto sobre la calidad de vida, es de vital importancia el seguimiento oftalmológico posterior al tratamiento con radioyodo. Este seguimiento debe garantizarse a todos los pacientes, presenten o no OG y/o factores de riesgo y debe ser de por lo menos un año, dado que este es el tiempo descripto para el desarrollo de estos eventos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. **Niepomniszcze H.** Tratado Argentino de Tiroides. e-book recuperado de http://www.tratadodetiroides.com.ar, 2010
2. **Bartalena L, Pinchera A, Marcocci C.** Management of Graves` ophthalmopathy: reality and perspectives. Endocr Rev 21:168-199, 2000
3. **Tanda M, Lai A, Bartalena L.** Relation between Graves` orbitopathy and radioiodine therapy for hyperthyroidism: facts and unsolved questions. Clin Endocrinol 69:845-847, 2008
4. **Aranow H, Day R.** Management of thyrotoxicosis in patients with ophthalmopathy: antithyroid regime determined primarily by ocular manifestations. J Clin Endocrinol Metab 25:1-10, 1965
5. **Hamilton R, Mayberry W, McConahey W, Hanson K**. Ophthalmopathy of Graves` disease: a comparison between patients treated surgically and patients treated with radioiodine. Mayo Clin Proc 42:812-8, 1967
6. **Kriss JP, Pleshakov V, Rosenblum AL, Holderness M, Sharp G, Utiger R**. Studies on pathogenesis of the ophthalmopathy of Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab 27:582-593, 1967
7. **Barbosa J, Wong E, Doe RP.** Ophthalmopathy of Graves` disease: outcome after treatment with radioactive iodine, surgery, or antithyroid drugs. Arch Intern Med 130:111-3, 1972
8. **Solem JH, Segaard E, Ytteborg J.** The course of endocrine ophthalmopathy during antithyroid therapy in a prospective study. Acta Med Scand 205:111-4, 1979
9. **Gwinup G, Elias AN, Ascher MS.** Effect on exophthalmos of various methods of treatment of Graves` disease. JAMA; 247:2135-8, 1982
10. **Calissendorff BM, Soderstrom M, Alveryd A.** Ophthalmopathy and hyperthyroidism: a comparison between patients receiving different antithyroid treatments. Acta Ophthalmol (Copenh); 64:698-703, 1986
11. **Vestergaard H, Laurberg P.** Radioiodine and aggravation of ophthalmopathy. Lancet 8:653-647, 1989
12. **Sridama V, DeGroot LJ.** Treatment of Graves` disease and the course of ophthalmopathy. Am J Med 87:70-3, 1989
13. **Barth A, Probst P, Bürgi H.** Identification of a subgroup of Graves' disease patients at higher risk for severe ophthalmopathy after radioiodine. J Endocrinol Invest 14:209-212, 1991
14. **Tallstedt L, Lundell G, Torring O, Wallin G, Ljunggren JG, Blomgren H, Taube A**. Ocurrence of ophthalmopathy after treatment for Graves´ hyperthyroidism. N Engl J Med 326:1733-8, 1992
15. **Vázquez-Chávez C, Nishimura Meguro E, Espinosa Said L, Delgado Falfar A, Sáinz de Viteri M.** Effect of the treatment of hyperthyroidism on the course of exophthalmos. Rev de Invest Clin, 44:241-247, 1992
16. **Bartalena L, Marcocci C, Bogazzi F, Manetti L, Tanda ML, Dell'Unto E, Bruno-Bossio G, Nardi M, Bartolomei MP, Lepri A, Rossi G, Martino E, Pinchera A.** Relation between therapy for hyperthyroidism and the course of Graves' ophthalmopathy. N Engl J Med 338:73-78, 1998
17. **Perros P, Kendall-Taylor P, Neoh C, Frewin S, Dickinson J.** Prospective Study of the Effects of Radioiodine Therapy for Hyperthyroidism in Patients with Minimally Active Graves' Ophthalmopathy. J Clin Endocrinol Metab 90(9):5321-5323, 2005
18. **Sisson J, Schipper M, Nelson C, Freitas J, Frueh B.** Radioiodine Therapy and Graves' Ophthalmopathy. J Nucl Med 49:923-930, 2008
19. **Acharya SH, Avenell A, Philip S, Burr J, Bevan JS, Abraham P.** Radioiodine therapy (RAI) for Graves' disease (GD) and the effect on ophthalmopathy: a systematic review. Clin Endocrinol (Oxf) 69:943-950, 2008
20. **Traisk F, Tallstedt L, Abraham-Nordling M, Andersson T, Berg G, Calissendorff J, Hallengren B, Hedner P, Lantz M, NyströmE, Ponjavic V, Taube A, Törring O, Wallin G, Asman P, Lundell G.** Thyroid-associated ophthalmopathy after treatment for Graves' hyperthyroidism with antithyroid drugs or iodine-131. J Clin Endocrinol Metab 94:3700-3707, 2009
21. **Atkinson S, McGregor A, Kendall-Taylor P, Peterson M, Smith B.** Effect of radioiodine on stimulatory activity of Graves' immunoglobulins. Clin Endocrinol 16:537-543, 1982
22. **Aizawa Y, Yoshida K, Kaise N, Kaise K, Fukazawa H, Kiso Y, Mori K, Sayama N, Kikuchi K, Abe K.** Long-term effects of adioiodine on thyrotrophin receptor antibodies in Graves' disease. Clin Endocrinol 42:517-522, 1995
23. **Laurberg P, Wallin G, Tallstedt L, Abraham-Nordling M, Lundell G, Tørring O.** TSH-receptor autoimmunity in Graves' disease after therapy with anti-thyroid drugs, surgery, or radioiodine: a 5-year prospective randomized study. Eur J Endocrinol 158:69-75, 2008
24. **Marcocci C, Bartalena L, Bogazzi F, Bruno-Bossio G, Pinchera A.** Relationship between Graves' ophthalmopathy and type of treatment of Graves' hyperthyroidism. Thyroid 2:171-178, 1992
25. **Ponto K, Zang S, Kahaly G.** The Tale of Radioiodine and Graves' Orbitopathy. Thyroid 20:785-93, 2010
26. **Tallstedt L, Lundell G, Taube A.** Graves' ophthal-

mopathy and tabacco smoking. Acta endocrinol-Cop, 129, 147-150, 1993
27. **Cawood T, Moriarty P, O'Farrelly C, O'Shea D.** 2007 Smoking and thyroid- associated ophthalmopathy: a novel explanation of biological link. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 92, 59-64
28. **Planck T, Shahida B, Parikh H, Ström K, Asman P, Brorson H, Hallengren B, Lantz M.** Smoking induces overexpression of immediate early genes in active Graves' ophthalmopathy. Thyroid 24: 1524-1532, 2014
29. **Vestergaard P.** Smoking and thyroid disorders-a meta analysis. Eur J Endocrinol 146:153-161, 2002
30. **Eckstein A, Plicht M, lax H, Neuhauser M, Mann K, Lederbogen S, Heckmann, C, Esser J, Morgenthaler N.** Thyrotropin receptor autoantibodies are independent risk factors for Graves' ophthalmopathy and help to predict severity and outcome of the disease. J Clin Endocrinol Metab, 91:3464-3470, 2006
31. **Tanda ML, Lai A, Bartalena L.** Relation between Graves' orbitopathy and radioiodine therapy for hyperthyroidism: facts and unsolved questions. Clin Endocrinol (Oxf) 69:845-847, 2008
32. **Torring O, Tallstedt L, Wallin G, Lundell G, Ljunggren JG, Taube A, Saaf M, Hamberger B.** Graves' hyperthyroidism: treatment with antithyroid drugs, surgery, or radioiodine-a prospective, randomized study. Thyroid Study Group. J Clin Endocrinol Metab 81:2986-2993, 1996
33. **Kung A, Yau C, Cheng A.** The incidence of ophthalmopathy after radioiodine therapy for Graves' disease: prognostic factors and the role of methimazole. J Clin Endocrinol Metab 79:542-546, 1994
34. **Tallstedt L, Lundell G, Blomgren H, Bring J.** Does early administration of thyroxine reduce the development of Graves´ ophthalmopathy after radioiodine treatment? Eur J Endocrinol 130:494-497, 1994
35. **Perros P, Crombie A, Matthews J, Kendall-Taylor P.** Age and gender influence the severity of thyroid-associated ophthalmopathy: a study of 101 patients attending a combined thyroid-eye clinic. Clin Endocrinol 38:367-372, 1993
36. **Goldstein S, Katowitz W, Moshang T, Katowitz J.** Pediatric thyroid-associated orbitopathy: the Children's hospital of Philadelphia experience and literature review. Thyroid 18:997-999, 2008
37. **Vannucchi G, Campi I, Covelli D, Dazzi D, Curro` N, Simonetta S, Ratiglia R, Beck-Peccoz P, Salvi M.** Graves' orbitopathy activation after radioactive iodine therapy with and without steroid prophylaxis. J Clin Endocrinol Metab 94:3381-3386, 2009
38. **Tellez M, Cooper J, Edmonds C.** Graves' ophthalmopathy in relation to cigarette smoking and ethnic origin. Clin Endocrinol (Oxf) 36:291-294, 1992
39. **Stan M, Bahn R.** Risk factors for development or deterioration of Graves' ophthalmopathy. Thyroid; 20:777-783, 2010
40. **Bartalena L, Marcocci C, Bogazzi F, Panicucci M, Lepri A, Pinchera A.** Use of corticosteroids to prevent progression of Graves' ophthalmopathy after radioiodine therapy for hyperthyroidism. N Engl J Med 321:1349-1352, 1989
41. **Lai A, Sassi L, Compri E, Marino F, Sivelli P, Piantanida E, Tanda ML, Bartalena L.** Lower dose prednisone prevents radioiodine-associated exacerbation of initially mild or absent Graves' orbitopathy: a retrospective cohort study. J Clin Endocrinol Metab 95:1333-1337, 2010
42. **Shiber, S, Stiebel-Kalish H.; Shimon, I.; Grossman, A, Robenshtok, E.** Glucocorticoid regimens for prevention of graves' ophthalmopathy progression following radioiodine treatment: systematic review and meta-analysis. Thyroid 24: 1515-1523, 2014
43. **Gamstedt A, Karlsson A.** Pretreatment with betamethasone of patients with Graves' disease given radioiodine therapy: thyroid autoantibody responses and outcome of therapy. J Clin Endocrinol Metab 73:125-131, 1991
44. **Chiovato L, Fiore E, Vitti P, Rocchi R, Rago T, Dokic D, Latrofa F, Mammoli C, Lippi F, Ceccarelli C, Pinchera A.** Outcome of thyroid function in Graves' patients treated with radioiodine: role of thyroid-stimulating and thyrotropinblocking antibodies and of radioiodine-induced thyroid damage. J Clin Endocrinol Metab 83:40-46, 1998
45. **Bahn R.** Editorial: The EUGOGO Consensus statement on the management of Graves' orbitopathy: equally applicable to North American clinicians and patients. Thyroid 18:281-282, 2008
46. **Bartalena L, Baldeschi L, Dickinson A, Eckstein A, Kendall-Taylor P, Marcocci C, Mourits M, Perros P, Boboridis K, Boschi A, Curro` N, Daumerie C, Kahaly G, Krassas G, Lane C, Lazarus J, Marino` M, Nardi M, Neoh C, Orgiazzi J, Pearce S, Pinchera A, Pitz S, Salvi M, Sivelli P, Stahl M, von Arx G, Wiersinga W.** Consensus statement of the European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) on management of GO. Eur J Endocrinol 158:273-285, 2008
47. **Bartalena L.** The Dilemma of how to Manage Graves' Hyperthyroidism in Patients with Associated Orbitopathy J Clin Endocrinol Metab, 96(3):592-599, 2011

Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Copyright ® 2015 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Vol 52 • Nº 3

MONOGRAFÍA

Polimorfismos del receptor de GH en pacientes acromegálicos

GH Receptor Polymorphisms in Acromegalic Patients

Céspedes ME

Hospital J. M. Ramos Mejía.Urquiza 609, CABA (1221)

RESUMEN

El receptor de la hormona de crecimiento (GHR) (hormona de crecimiento. media los efectos de GH. Se identificaron varias isoformas de dicho receptor, producto de polimorfismos en las secuencias codificantes del gen del GHR. La isoforma (d3-GHR) carece de una secuencia de 22 aminoácidos codificada por el exón 3, y si bien su capacidad de unión al ligando se mantiene intacta, afectaría las propiedades funcionales del GHR, y podría facilitar la activación del GHR. Se observó que el 50 % de los pacientes acromegálicos tienen al menos un alelo d3.

Se reportó que el alelo d3 contribuyó como predictor de respuesta posquirúrgica con niveles significativamente menores de hormona de crecimiento (GH) a diferencia de los fl-GHR (forma completa), con similares niveles de IGF-1 (insulin-likegrowth factor 1). La ausencia del exón 3 se asoció además con mayor probabilidad de no alcanzar IGF-I normal después del tratamiento tanto quirúrgico como médico. Los portadores d3-GHR se asocian con menor dosis requerida de PEG (Pegvisomant), siendo el mecanismo de esta mayor sensibilidad desconocido. Estos pacientes también podrían tener mayor prevalencia de comorbilidades acromegálicas.

Estos estudios demuestran la importancia del genotipo del GHR, no solo como variable predictora de evolución clínica, sino que su evaluación podría ser útil para individualizar la terapia óptima en cada paciente. **Rev Argent Endocrinol Metab 52:163-169, 2015**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Palabras clave: acromegalia, receptor de la hormona de crecimiento, polimorfismos del GHR, isoformas del GHR

ABSTRACT

The growth hormone receptor mediates the effects of GH. Several isoforms of this receptor, as a product of polymorphisms in the coding sequences of GHR gene, have been identified. The d3-GHR isoform lacks a 22-amino-acid sequence encoded by exon 3, and although its ligand binding capacity remains intact, its deletion would affect the functional properties of GHR, and could facilitate the activation of the GHR. It has been reported that 50 % of acromegalic patients have at least one d3 allele.

The d3 allele has been shown to contribute to predict postoperative response presenting significantly lower levels of GH in contrast to fl-GHR (full-length), with similar levels of IGF-1. The absence of exon 3 was also associated with abgreater likelihood of failing to achieve normal IGF-I after both surgical and medical treatment. In carriers of d3-GHR, lower doses of PEG (Pegvisomant) were required; the mechanism of this increased sensitivity is unknown.These patients may also have a higher prevalence of acromegalic comorbidities. These studies demonstrate the importance of the GHR genotype, which may not only contribute to predict clinical outcome, but also help to identify the optimal therapy for each patient. **Rev Argent Endocrinol Metab 52:163-169, 2015**

No conflicts of interest exist.

Key words: acromegaly, receptor of growth hormone, GHR polymorphisms, isoforms of GHR

Recibido: 11-03-2015 Aceptado: 27-04-2015

Dirección postal: Céspedes, M. E. e-mail: mecespedes@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La acromegalia es el síndrome clínico que resulta de la elevación crónica y persistente de los niveles circulantes de GH. La misma actúa a través de su receptor periférico, el cual constituye el efector más importante de la acción hormonal. El GHR media los efectos de la GH, estimulando el metabolismo intermedio, la proliferación y diferenciación celular, lo que en última instancia se traduce en crecimiento corporal acral exagerado, alteraciones orgánicas, tanto estructurales como funcionales, y metabólicas que ocurren en la acromegalia.

Se han identificado varias isoformas de dicho receptor, producto de polimorfismos en las secuencias codificantes del gen del GHR, una de las cuales carece de una secuencia de 22 aminoácidos codificada por el exón 3, que si bien su capacidad de unión al ligando se mantiene intacta, esta deleción del exón 3 afecta las propiedades funcionales del GHR.

Hay factores desconocidos aún, que determinan la evolución y el comportamiento de la enfermedad. Dada la morbimortalidad que conlleva la acromegalia, resulta crucial intentar dilucidarlos, particularmente en pacientes con enfermedad más agresiva.

En esta monografía se destaca entonces si el genotipo del GHR influye de alguna manera en la expresión clínica y/o bioquímica de la acromegalia, además de valorar por otro lado, si existe alguna repercusión en cuanto a la evolución de la enfermedad y si condiciona la respuesta a una terapéutica determinada.

EL RECEPTOR DE GH

La GH promueve el crecimiento y diferenciación tisular, ya sea directamente a través de su GHR e indirectamente a través de la estimulación de la síntesis hepática de IGF-1, el cual tiene efectos proliferativos, antiapoptóticos e importantes funciones metabólicas, además de una vida media más prolongada que la GH.

El GHR se expresa en muchos tejidos: el hígado contiene abundantes receptores para GH; otros tejidos periféricos también expresan GHR en menor cantidad, incluyendo el músculo y la grasa[1]. Es una proteína de 620 aminoácidos, de 70 kd, proteína clase I de la superfamilia de los receptores citoquinas, y contiene tres dominios:

1. uno extracelular (DEC): dominio de unión a la hormona,
2. un dominio transmembrana, y
3. un dominio citoplasmático: componente de señalización.

La superfamilia de receptores de GH es homóloga con los receptores de prolactina, relacionados además funcional y estructuralmente a una gran variedad de factores de crecimiento como interleuquinas 2 a 7, eritropoyetina, interferón, y factor estimulante de colonias. Su activación ocurre cuando se forma el complejo GH/GHR, que consiste en una molécula de GH ligada secuencialmente a dos moléculas de GHR, que conducen a la dimerización del receptor, y es seguida por una rápida activación de la tirosinkinasa JAK2 que conduce a la fosforilación de moléculas de señalización intracelular, incluyendo los activadores de señal de transducción de las proteínas transcripción (STAT 1, 3 y 5). Estas proteínas fosforiladas son translocadas directamente al núcleo celular, donde provocan expresión de genes GH específicos mediante su unión al ADN nuclear e inician la transcripción proteica[1]. El gen del GHR está localizado en el brazo corto del cromosoma 5 (región p13.1-p12) y contiene nueve exones que codifican el receptor[2].

ISOFORMAS DEL GHR

Varias isoformas del GHR se han identificado, una de estas isoformas carece de una secuencia de 22 aminoácidos codificada por el exón 3[3]. Así, en la región codificante del ARNm que compromete al DEC del receptor, se pueden hallar 2 isoformas: una que contiene al exón 3 dando la forma completa del GHR o full-length (fl) y otra que carece del mismo (d3). El mecanismo por el cual se produce esta isoforma, se cree que podría ser por una *deleción genómica* de 2.7 pb que incluiría al exón 3 y no a un "splicing" alternativo, como se pensaba en un principio[2,4]. Esto induce cambios conformacionales en el DEC que podría facilitar la activación inducida por el ligando del GHR. Es decir, son dos transcripciones de ARNm, que difieren en la codificación del mismo, en uno contiene el exón 3 (fl-GHR) y en otro falta (d3-GHR). Estudios "in vitro", mostraron una mayor capacidad transcripcional del d3-GHR comparada con fl-GHR[5].

De la heterogeneidad de ambas isoformas resultan los genotipos homocigota para fl, homocigota para d3 y heterocigota fl/d3 para el GHR. En la mayoría de los estudios que han examinado la fre-

cuencia de distribución de estas isoformas de GHR en los controles sanos, aproximadamente la mitad de los sujetos son homocigotos para la fl-GHR, y el polimorfismo d3-GHR se produce en el 30-40 % en estado heterocigoto y en el 10-20 % en homocigoto[6].

Durante muchos años, el significado funcional de tales expresiones dismórficas se desconocía porque la afinidad de unión "in vitro" de ambos (fl-GHR y d3-GHR) para GH 22-kDa, GH 20-kDa, GH placentaria (GHV), lactógeno placentaria, prolactina ovina, y otros ligandos, parecía ser la misma[7]. Por lo tanto, cualquier diferencia funcional o biológica entre las dos isoformas del receptor debía proceder de diferencias en la dimerización inducida por el ligando, la señal de transducción o el reciclaje de los receptores. Más recientemente, experimentos en células de cultivo de fibroblastos cotransfectadas HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293 cells) han demostrado que la transducción de señal inducida por GH es significativamente mayor a través de homo o heterodímeros d3-GHR que a través de homodímeros fl-GHR. En este estudio, la diferencia en la activación de STAT5 de células transfectadas llevando al menos un alelo d3-GHR comparadas con células homocigotas para el fl-GHR fue particularmente evidente a mayores concentraciones de GH (3-50 ng/ml)[5].

Algunos estudios que involucran niños nacidos pequeños para su edad gestacional[5,8], niños con talla baja idiopática[5], niñas con síndrome de Turner[8] y los niños con severa deficiencia de GH[9], sugirieron que la presencia del polimorfismo d3-GHR les confiere una mayor respuesta a la administración exógena de GH humana recombinante. Sin embargo, otros autores no han podido confirmar estos resultados[10,11]. A partir de estos hallazgos, se comenzó a evaluar qué es lo que ocurre con el GHR en pacientes acromegálicos, su implicancia y significado en cuanto a la evolución y tratamiento.

GHR Y ACROMEGALIA

La acromegalia representa un estado de exceso de GH con un fenotipo variable, que no depende únicamente del grado de hipersomatotropinemia. El espectro clínico varía desde una condición relativamente asintomática con lento y progresivo compromiso acral, a un severo trastorno incapacitante, que incluye cefalea, artropatía, síndromes de compresión nerviosa, diabetes mellitus (DM), hipertensión arterial (HTA) e incluso miocardiopatía, que finalmente compromete la expectativa y la calidad de vida. En la mayoría, pero no en todos los pacientes, el fenotipo clínico se correlaciona con el grado de hipersecreción de GH y con el resultante exceso de producción de IGF-1[12].

Como con muchas otras enfermedades crónicas, los factores genéticos y ambientales juegan un rol en la variabilidad clínica del fenotipo acromegálico. Es en este sentido, en que se comenzó a estudiar qué es lo que ocurría con el d3-GHR, con el fin de determinar si tenía alguna relevancia su evaluación; es decir, intentar dilucidar si pacientes con acromegalia que tienen el genotipo d3-GHR podrían tener una mayor morbilidad clínica, entre otras cosas. Lo que se observó fue que el 50 % de los pacientes acromegálicos tienen al menos un alelo d3 y estos pacientes, niveles de GH más bajos para cualquier concentración de IGF-1 sérica comparadas con los portadores homocigotos de fl-GHR[13]; y también se asociaron a valores más bajos de GH después del tratamiento. La mayoría de los pacientes que tenían cifras elevadas de IGF-I en presencia de valores de GH normalizados postcirugía eran portadores de al menos un alelo d3 y casi el 40 % de los pacientes portadores del alelo d3-GHR mostraron resultados de GH e IGF-1 discordantes luego del tratamiento con SSA (análogos de somatostatina)[14]. Dicho de otro modo, la mayoría de los pacientes d3-GHR no parecerían mostrar concordancia en los niveles de GH e IGF-1; esto podría significar que, entre los pacientes portadores d3-GHR, hay diferente sensibilidad del GHR debido a factores desconocidos o a diferencias en la sensibilidad a la GH.

En los individuos sanos, la prevalencia del polimorfismo representa alrededor del 50 % de la población general[6]. Estas diferencias en la sensibilidad de hormona de crecimiento podrían ser compensadas por el ajuste en la secreción de GH. Es decir, el control normal de retroalimentación negativa de la secreción de GH debe compensar las diferencias en la sensibilidad de GH a nivel de tejido blanco, y es este mecanismo de adaptación el que está claramente atenuado en la acromegalia[15]. De este modo, a concentraciones de GH suprafisiológicas encontradas en la acromegalia, las diferencias en la señalización a través de la isoforma de GHR pueden contribuir a la variabilidad del fenotipo clínico visto en esta compleja enfermedad.

Tener un GHR más sensible podría explicar en parte, algunos casos inusuales de acromegalia con elevaciones séricas menores de GH pero valores

claramente anormales en los niveles IGF-1[12]. Del mismo modo, las diferencias en el genotipo GHR podrían ser responsables de las discordancias postoperatorias en los niveles de GH e IGF-1[16]. Bianchi y col., observaron que el polimorfismo de d3 fue capaz de influir en gran medida en la respuesta bioquímica al tratamiento quirúrgico. Los portadores d3-GHR mostraron niveles significativamente menores de GH en relación con los fl-GHR, con similares niveles de IGF-I. Estos hallazgos concuerdan con la hipótesis de que, en presencia de niveles de GH cercanos al valor normal, la supersensibilidad del GHR podría ser desenmascarada[14].

Por otra parte entonces, el alelo d3 contribuyó como variable independiente a disminuir los niveles de GH después de la cirugía junto con los niveles GH prequirúrgicos. Esto podría confirmar, una mayor relevancia clínica de la determinación de la isoforma d3 en la acromegalia, que podría llegar a ser un predictor importante del resultado del tratamiento de la enfermedad[14].

Más aún, recientemente se asoció a los pacientes acromegálicos portadores de la isoforma d3 a una situación de mayor riesgo para las complicaciones más graves de la enfermedad, así como un control bioquímico más difícil[17]. Estos hallazgos avalan la existencia de una subpoblación acromegálica con GHR más sensibles. Mercado y col.[17] encontraron que, los portadores d3-GHR tenían una prevalencia de DM entre el 44 y 47 % (diferente a la prevalencia previamente reportada por el autor del 32 % en población acromegálica general), y esto hace suponer que los portadores d3-GHR están en mayor riesgo de ser diabéticos que los sujetos homocigotos para el genotipo fl-GHR.

Más sorprendente fueron los resultados del análisis multivariado según el cual la ausencia del exón 3 tanto homo como heterocigoto se asoció con una mayor probabilidad de no alcanzar IGF-I normal después del tratamiento tanto quirúrgico como médico[17]. Según reportes de Bianchi y col., alrededor de un 20 % de los pacientes con niveles elevados de IGF-I después de la cirugía tienen niveles de GH que podrían ser definidos como normales de acuerdo a consensos mundiales. Curiosamente, el 70 % de estos pacientes eran portadores del alelo d3, lo que sugiere que, aún niveles muy bajos de GH podrían mantener actividad biológica significativa en presencia de un receptor supersensible[14]. Estos autores no encontraron asociación con formas más agresivas de enfermedad en aquellos pacientes con niveles más bajos de GH sérica portadores d3-GHR como fue sugerido previamente[13,17], lo cual podría ser debido a que la población estudiada con niveles de GH muy elevados, podría enmascarar la sensibilidad diferente del receptor, si bien se observó una tendencia hacia niveles de GH más bajos en los portadores d3-GHR.

Otro estudio más reciente[18] evaluó a 86 pacientes acromegálicos con polimorfismo d3-GHR y su impacto a largo plazo, en pacientes con enfermedad ya en remisión, es decir curados. Lo que se observó fue que el polimorfismo d3-GHR se asoció con una mayor prevalencia de pólipos adenomatosos colónicos y dólicocolon. Los pacientes con al menos un alelo d3 presentaron una mayor prevalencia de osteoartritis, más pronunciada en cadera. La prevalencia de la otras comorbilidades asociadas con la acromegalia, tales como síndrome metabólico o fracturas vertebrales y no vertebrales, no difiere entre los genotipos. Tampoco se halló efecto del polimorfismo a largo plazo en la DM tipo 2, y esto concuerda con el hecho de estas comorbilidades parecen ser complicaciones reversibles de la acromegalia luego del control bioquímico[19].

Como se mencionó anteriormente, Mercado y col.[17] hallaron una mayor prevalencia de DM tipo 2 en pacientes con acromegalia activa con el genotipo d3, lo cual podría explicarse por el hecho de que la DM tipo 2 es más frecuentemente observada en la enfermedad activa, pero por otro lado es potencialmente reversible luego del control bioquímico de la enfermedad[19]. La HTA no mejora con el tratamiento exitoso de la acromegalia, por lo tanto podría ser considerada como una complicación crónica de la enfermedad. En este sentido, no hubo un efecto significativo del genotipo d3-GHR sobre su prevalencia; así como tampoco sobre la densidad mineral ósea[18]. No está claro si estos resultados son debidos a la excesiva actividad de la GH durante la enfermedad no controlada o son mera consecuencia de la presencia del polimorfismo d3-GHR.

Por otro lado, trabajos recientes evaluaron si el polimorfismo d3 tenía alguna relevancia en el tratamiento con PEG, análogo de GH obtenido mediante ingeniería genética con propiedades antagónicas a nivel del GHR. Como fue mencionado, el polimorfismo d3 del gen GHR se ha asociado con un aumento de la capacidad de respuesta a la GH humana recombinante en pacientes pediátricos. En este sentido, se realizó un estudio con 19 pacientes acromegálicos tratados con PEG para analizar si el d3-GHR podría influir en la capa-

cidad de respuesta a dicha terapia[20]. Se reportó que el genotipo d3-GHR se asoció con un menor tiempo de tratamiento para la normalización de IGF-1 y una disminución del 27 % de la dosis de PEG requerida, de modo que solo uno de los nueve portadores del alelo d3 requirió una dosis de al menos 20 mg/d de PEG, en comparación con siete de los 10 del grupo fl-GHR; es decir, aquellos no portadores d3-GHR. Esto sugiere que la presencia del genotipo d3-GHR podría hacer a estos pacientes supersensibles al PEG.

En otro estudio[21], se evaluaron 44 pacientes acromegálicos con enfermedad activa y resistencia a SSA. Los resultados mostraron que d3-GHR se asocia con una mayor sensibilidad a la terapia de PEG en acromegálicos resistentes, en términos de dosis más bajas requeridas y menos tiempo necesario para normalizar IGF-1. Sin embargo, no todos los resultados avalan esta posibilidad, recientemente Filopanti y col., evaluaron 127 pacientes acromegálicos tanto con monoterapia con PEG como terapia combinada con PEG más SSA, pero no confirmó una mejor respuesta a PEG en portadores d3-GHR[22]. Este mecanismo planteado de una mayor sensibilidad al PEG en d3-GHR es esencialmente desconocido. Varias hipótesis se podrían formular para explicar estos resultados, la explicación más intuitiva podría ser que los receptores d3 tienen una afinidad mayor por PEG que para la GH nativa. Sin embargo, la unión de GH a las dos isoformas de GHR se ha estudiado en varios estudios sin conclusiones definitivas[5]. Una hipótesis alternativa podría ser que los pacientes que expresan d3-GHR podrían tener una ventaja funcional en términos de dimerización del receptor o transducción de señal, y bloqueando un receptor con propiedades funcionales mejoradas podría conducir a una amplificación de la inhibición de acción de PEG. Por otra parte, las diferencias en la habilidad de internalizar PEG también podrían explicar estos resultados. Por último, en presencia de menores niveles circulantes de GH endógena, podrían ser necesarios dosis más bajas de PEG para competir a nivel del receptor[20].

Los estudios experimentales han demostrado que la transducción de señal de GH a través de d3-GHR es de aproximadamente un 30 % superior que a través de fl-GHR[5], y estos datos experimentales han sido apoyados por estudios clínicos[17,23]. Con respecto al fenómeno de escape, reportado en el tratamiento con PEG, se observó que la dosis en la que ocurrió dicho fenómeno fue menor en los pacientes d3-GHR (15 mg en el grupo d3-GHR vs 27 mg en el grupo fl-GHR, p 0.002)[22]. El mecanismo de este fenómeno de escape no se entiende claramente, en este estudio la taquifilaxia relacionados con los anticuerpos anti-PEG había sido descartada previamente en el tratamiento a corto plazo con PEG[24], aunque la taquifilaxia a largo plazo o el aumento de los niveles de proteína de unión a GH podrían competir con PEG por el GHR y podrían hipotéticamente ser factores contribuyentes[22].

CONCLUSIONES

En la acromegalia, varios factores que no están claramente identificados podrían modular la expresión fenotípica de la hipersecreción de GH en términos de presentación clínica y/o bioquímica, además de intervenir en su evolución posterior.

De todo lo expuesto surge la importancia del genotipo del GHR, no solo para determinar la evolución clínica de aquellos pacientes acromegálicos que lo poseen, sino que además su estudio podría ser de utilidad para individualizar la opción terapéutica más adecuada.

Como se deja entrever, se requerirán más estudios, preferentemente prospectivos, para determinar su verdadero impacto clínico. De esta manera, el mayor entendimiento de la enfermedad abrirá probablemente un abanico de posibilidades, pudiendo constituir una nueva concepción en la evaluación de esta patología.

AGRADECIMIENTOS

A toda la División Endocrinología del Hospital J. M. Ramos Mejía, por la dedicación y generosidad con que me han brindado todos los conocimientos; y en particular a la Dra. Amelia Rogozinski, no solo por su aporte académico cotidiano sino por su invalorable apoyo en la confección de esta monografía.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Shlomo Melmed, David Kleinberg, Edward O. Reiter, Ron G. Rosenfeld.** Anterior Pituitary. Normal and Aberrant Growth.Williams Textbook of Endocrinology. 11th Edition. Chapter 8 and 23, 2007
2. **Godowski PJ, Leung DW, Meacham LR, Galgani JP, Hellmiss R, Keret R, Rotwein PS, Parks JS, Laron Z, Wood WI.** Characterization of the human growth hormone receptor gene and demon-

stration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. Proc Natl Acad Sci USA 86:8083-8087, 1989
3. **Mercado M, Dávila N, McLeod JF, Baumann G.** Distribution of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid containing and lacking exon 3 in human tissues. J Clin Endocrinol Metab 78:731-735, 1994
4. **Pantel J, Machinis K, SobrierML, Duquesnoy P, GoossensM, Amselem S.** Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution. J Biol Chem 275:18664-18669, 2000
5. **Dos Santos C, Essioux L, Teinturier C, Tauber M, Goffin V, Bougnères P.** A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone. Nat Genet 36:720-724, 2004
6. **Audi L, Esteban C, Carrascosa A, Espadero R, Pérez-Arroyo A, Arjona R, Clemente M, Wollman H, Fryklund L, Parodi LA.** Exon 3-deleted/fulllength growth hormone receptor polymorphism genotype frequencies in Spanish short small-for-gestational-age (SGA) children and adolescents (n= 247) and in adult control population (n= 289) show increase fl/fl in short SGA. J Clin Endocrinol Metab 91:5038-5043, 2006
7. **Sobrier ML, Duquesnoy P, Duriez B, Amselem S, Goossens M.** Expression and binding properties of two isoforms of the growth hormone receptor. FEBS Lett 319:16-20, 1993
8. **Binder G, Baur F, Schweizer R, Ranke MB.** The d3-growth hormone (GH) receptor polymorphism is associated with increased responsiveness to GH in Turner syndrome and short small-for-gestational-age children. J Clin Endocrinol Metab 91:659-664, 2006
9. **Jorge AA, Marchisotti FG, Montenegro LR, Carvalho LR, Mendonca BB, Arnhold IJ.** Growth hormone (GH) pharmacokinetics: influence of GH receptor exon 3 retention or deletion on first-year growth response and final height in patients with severe GH deficiency. J Clin Endocrinol Metab 91: 1076-1080, 2006
10. **Carrascosa A, Esteban C, Espadero R, Fernández-Cancio M, Andaluz P, Clemente M, Audí L, Wollman H, Fryklund L, Parodi L, Spanish SGA StudyGroup.** The d3/fl-growth hormone (GH) receptor polymorphism does not influence the effect of GH treatment (66 mcg/kg per day) or the spontaneous growth in short non-GH-deficient small-for-gestational-age children: results from a two-year controlled prospective study in 170 Spanish patients. J Clin Endocrinol Metab 91:3281-3286, 2006
11. **Blum WF, Machinas K, Shavrikova EP, Keller A, Stobbe H, Pfaeffle RW, Amselem S.** The growth response to growth hormone (GH) treatment in children with isolatedGHdeficiency is independent of the presence of the exon3-minus isoform of the GH receptor. J Clin Endocrinol Metab 91:4171-4174, 2006
12. **Mercado M, Espinosa de los Monteros AL, Sosa E, Cheng S, Mendoza V, Hernández I, Sandoval C, Guinto G, Molina M.** Clinical-biochemical correlations in acromegaly at diagnosis and the real prevalence of biochemically discordant disease. Horm Res 62:293-299, 2004
13. **Schmid C, Krayenbuehl PA, Bernays RL, Zwimpfer C, Maly FE, Wiesli P.** Growth hormone (GH) receptor isoform in acromegaly: lower concentrations of GH but not insulin-like growth factor-1 in patients with a genomic deletion of exon 3 in the GH receptor gene. Clin Chem 53:1484-1488, 2007
14. **Bianchi A, Giustina A, Cimino V, Pola R, Angelini F, Pontecorvi A, De Marinis L.** Influence of Growth Hormone Receptor d3 and Full-Length Isoforms on Biochemical Treatment Outcomes in Acromegaly. J Clin Endocrinol Metab 94(6):2015-2022, 2009
15. **Jaffe CA, Pan W, Brown MB, DeMott-Frieberg R, Barkan AL.** Regulation of GH secretion in acromegaly: reproducibility of daily GH profiles and attenuated negative feedback by IGF-I. J Clin Endocrinol Metab 86:4364-4370, 2001
16. **Espinosa de los Monteros AL, Sosa E, Cheng S, Ochoa R, Sandoval C, Guinto G, Mendoza V, Hernández I, Molina M, Mercado M.** Biochemical evaluation of disease activity after pituitary surgery in acromegaly: a critical analysis of patients who spontaneously change disease status. Clin Endocrinol 64:245-249, 2006
17. **Mercado M, González B, Sandoval C, Esquenazi Y, Mier F, Vargas G, de los Monteros AL, Sosa E.** Clinical and biochemical impact of the d3 growth hormone receptor genotype in acromegaly. J Clin Endocrinol Metab 93:3411-3415, 2008
18. **Wassenaar M, Biermasz N, Pereira A, Van der Klaauw A, Smit J, Roelfsema F, Van der Straaten T, Cazemier M, Hommes D, Kroon H, Kloppenburg M, Guchelaar H, Romijn J.** The Exon-3 Deleted Growth Hormone Receptor Polymorphism Predisposes to Long-Term Complications of Acromegaly. J Clin Endocrinol Metab, 94(12):4671-8, 2009
19. **Biermasz NR, Pereira AM, Smit JW, Romijn JA, Roelfsema F.** Morbidity after long-term remission for acromegaly: persisting joint-related complaints cause reduced quality of life. J Clin Endocrinol Metab 90:2731-2739, 2005
20. **Bianchi A, Mazziotti G, Tilaro L, Cimino V, Veltri F, Gaetani E, Pecorini G, Pontecorvi A, Giustina A, De Marinis L.** Growth hormone receptor polymorphism and the effects of pegvisomant in acromegaly. Pituitary 12:196-199, 2009
21. **Bernabeu I, Alvarez-Escolá C, Quinteiro C, Lucas T, Puig-Domingo M, Luque-Ramírez M, Miguel-Novoa P, Fernandez-Rodriguez E, Halperin I, Loidi L, Casanueva F, Marazuela M.** The Exon 3-Deleted Growth Hormone Receptor Is Associated with Better Response to Pegvisomant Therapy in Acromegaly. J Clin Endocrinol Metab, 95(1):222-9, 2010
22. **Filopanti M, Olgiati L, Mantovani G, Corbetta S, Arosio M, Gasco V, De MarinisL, Martini**

C, Bogazzi F, CannavòS, Colao A, Ferone D, Arnaldi G, Pigliaru F, Peri A, Angeletti G, Jaffrain-Rea ML, Lania AG, Spada A. Growth hormone receptor variants and response to pegvisomant in monotherapy or in combination with somatostatin analogs in acromegalic patients: a multicenter study. J Clin Endocrinol Metab, 97(2):E165-72, 2012

23. **Wassenaar MJ, Dekkers OM, Pereira AM, Wit JM, Smit JW, Biermasz NR, Romijn JA.** Impact of the exon 3-deleted growth hormone (GH) receptor polymorphism on baseline height and the growth response to recombinant human GH therapy in GH-deficient (GHD) and non-GHD children with short stature: a systematic review and meta-analysis. J Clin Endocrinol Metab 94(10):3721-3730, 2009
24. **Van der Lely AJ, Hutson RK, Trainer PJ, Besser GM, Barkan AL, Katznelson L, Klibanski A, Herman-Bonert V, Melmed S, Vance ML, Freda PU, Stewart PM, Friend KE, Clemmons DR, Johannsson G, Stavrou S, Cook DM, Phillips LS, Strasburger CJ, Hackett S, Zib KA, Davis RJ, Scarlett JA, Thorner MO.** Long-term treatment of acromegaly with pegvisomant, a growth hormone receptor antagonist. Lancet 358(9295):1754-1759, 2001