



Revisión

Estudios del laboratorio de diversos parámetros orientados a tratar de dilucidar la fisiopatología del síndrome de ovarios poliquísticos. Parte 1



H.E. Scaglia^a,* G. Buccini, C. Chichizola, M.E. Colombani, N. Corazza, C. Corthey, L. Guevel, G. Ibañez, E. Lacoste, S. Nosetto, R. Piaggio, O. Riesco, S. Sandoz, J. Scaglia^a, A.M. Viola, D. Wolfthal, C.C. Zylbersztein

^a Laboratorio de Determinaciones Hormonales. Hospital Italiano de La Plata

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 6 de junio de 2017

Aceptado el 19 de enero de 2018

Palabras clave:

Testosterona

SHBG

Testosterona libre

SOP

Hirsutismo

RESUMEN

Esta revisión fue realizada con el fin de evaluar nuestros resultados de laboratorio así como aquellos de la literatura que constituyen, a nuestro entender, aportes significativos en el síndrome de ovarios poliquísticos (SOP). Nuestro especial énfasis será presentar las limitaciones de las metodologías empleadas por nuestro grupo, comparativamente a las reportadas por otros investigadores. La determinación de andrógenos, en particular de Testosterona (TT), es quizá la de mayor complejidad dado que los resultados con los diferentes inmunoensayos empleados en nuestro medio producen resultados muy variables por los diferentes métodos y aún entre laboratorios que usan la misma metodología. La técnica de referencia es la cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masa (LC-MSMS), de difícil aplicación en laboratorios de análisis clínicos debido a su alto costo y la imposibilidad de resolver numerosas muestras. En estudios previos demostramos que de los métodos habitualmente usados para evaluar la TT circulante, solo en 2 inmunoensayos los resultados obtenidos fueron satisfactoriamente validados indirectamente según el criterio del Consenso de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, USA) contra LC-MSMS, los cuales fueron comparables a dicha metodología con niveles superiores a 0,5 ng/ml. El SOP puede presentar factores de riesgo aumentados para la enfermedad cardiovascular y la diabetes II. Estos factores no están debidamente categorizados en función de los distintos fenotipos del SOP. Se evaluarán los principales analitos empleados con este objetivo y los nuevos que aporten elementos de mayor especificidad en este sentido.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: info@iabe.com.ar (Hugo Estanislao Scaglia)

Laboratory studies of several parameters aimed to elucidate the pathophysiology of polycystic ovary syndrome. First part

A B S T R A C T

Keywords:

Testosterone
SHBG
Free testosterone
PCOS
Hirsutism

This review was performed in order to evaluate our laboratory results as well as those of the literature that constitute, in our opinion, significant contributions in these pathophysiologicals. Our special emphasis will be on presenting the limitations of the methodologies used by our group, compared to those reported by other researchers. The determination of androgens, in particular Testosterone (TT), is perhaps the most complex since the results with the different immunoassays used in our environment produce very variable results by the different methods and even between laboratories that use the same methodology. The reference technique is LC-MSMS, difficult to apply in clinical analysis laboratories because of its high cost and the inability to solve numerous samples. In previous studies, we demonstrated that, in comparison to LC-MSMS with the usual methods for evaluating circulating TT, the results obtained in only 2 immunoassays were satisfactorily validated indirectly according to the criteria of CDC against LC-MSMS, which were comparable to that methodology with levels higher than 0.5 ng/ml. PCOS may have increased risk factors for cardiovascular disease and diabetes II. These factors are not properly categorized according to the different phenotypes of PCOS. The main analytes used for this purpose will be evaluated and new ones that contribute elements of greater specificity in this sense.

Introducción

Los estados hiperandrogénicos son entidades clínicas que cursan con un exceso de andrógenos. Se determina por niveles aumentados de Testosterona total (TT), de T biodisponible (Tbio) y/o de T libre (TL). Resulta útil también la valoración de los precursores de T como la DHEA sulfato (DHEAs) y la Androstenediona (A4), así como de otros metabolitos los cuales son importantes y cuyo significado clínico discutiremos en el desarrollo de esta revisión¹⁻⁴. El andrógeno de mayor potencia biológica es la 5 alfa dihidrotestosterona (5 α DHT) producida por la acción de la 5 α reductasa (5 α R) sobre la T. Aunque han sido descriptos trabajos que evalúan este esteroide, todavía no es de aplicación rutinaria debido a sus escasos niveles circulantes y a que no se han desarrollado técnicas de difusión masiva con la sensibilidad apropiada para poder evaluarlo. Haremos un resumen de lo que se ha presentado en la literatura y discutiremos técnicas indirectas para evaluar la actividad 5 α R.

Clínicamente, las pacientes hiperandrogénicas se caracterizan por presentar hirsutismo, acné, seborrea y/o alopecia; además, pueden estar asociadas entre otras patologías a oligo-anovulación, infertilidad y manifestaciones de insulino-resistencia (IR).

En general, la significación clínica de mayor relevancia y frecuencia para evaluar los niveles androgénicos en mujeres está dado en las siguientes situaciones:

- En el diagnóstico de hirsutismo idiopático conjuntamente con otras determinaciones, con imágenes y la clínica².
- En el diagnóstico del síndrome de ovario poliquístico (SOP)³⁻⁴.
- En el estudio de mujeres con tumores virilizantes.

Esta revisión se centralizará en parte en la importancia de la determinación de TT y TL y su significación en el diagnóstico del SOP, particularmente en los fenotipos de los mismos. El énfasis de esta presentación estará dado en la revisión bibliográfica y en la discusión de nuestros resultados

referidos a los métodos previos y actuales respecto a las modificaciones en la sensibilidad, especificidad y precisión de su determinación. También se discutirán las limitaciones de dichas metodologías y los criterios de validación de las mismas.

A) Parámetros relevantes para la fenotipificación del SOP. Diversos consensos realizados

El SOP es considerado cuando la paciente presenta todas o algunas de las siguientes características:

- Cuadro clínico compatible con hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico con niveles aumentados de TT y/o algunos de sus precursores.
- Imágenes de ovarios poliquísticos.
- Alteraciones del ciclo menstrual.

Las distintas reuniones de consensos realizados por expertos en el marco de diferentes sociedades científicas han definido distintos fenotipos que fueron apareciendo con el transcurrir del tiempo. Esto no significó que una nueva fenotipificación haya invalidado la anterior. En diferentes trabajos actuales los distintos investigadores adoptan como criterio de selección aquel que considera más relevante para el estudio que se desea realizar. En general, las de mayor difusión son tres, y el resumen de los criterios consensuados se muestra en la fig. 1:

1. Conferencia de expertos auspiciado por el National Institute of Child Health and Human Disease. National Institute of Health (NIH) 16-18 de abril, 1990⁵.
2. Consenso Rötterdam 2003. Modificaciones al consenso de 1990 respecto al criterio diagnóstico del SOP⁶. Con este consenso, se considera SOP cuando la paciente presente al menos dos de los tres criterios enunciados⁶.
3. Posición de la Androgen Excess Society-Polycystic Ovary Syndrome (AES-PCOS)⁷.

Se considera a una paciente con SOP cuando presenta hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico con uno o ambos criterios de la disfunción ovárica⁷.

Para los tres consensos deben excluirse pacientes

Tabla 1 - Media ± DS de los niveles de testosterona (TT) (ng/ml) evaluados en el grupo de pacientes con valores normales de TT por LC-MSMS por Architect de acuerdo a ambos protocolos (estudio 1 y estudio 2).

	TT estudio1	Estudio 1 vs LC-MSMS (p)	Estudio 2 vs 1 (p)	TT estudio 2	Estudio 2 vs LC-MSMS (p)
Lab 1 n:36	0,330±0,050	<0,0001	0,0636	0,375±0,124	<0,0001
Lab 2 n:36	0,360±0,047	<0,0001	0,7808	0,353±0,120	<0,0004
Lab 3 n:36	0,335±0,055	<0,0001	0,4242	0,319±0,106	<0,0184
Lab 4 n:36	0,329±0,005	<0,0001	0,3056	0,350±0,109	<0,0025
Lab 5 n:36	0,349±0,005	<0,0001	0,1765	0,327±0,101	<0,0068
LC-MSMS	0,270±0,060				

El estudio estadístico (columnas 3, 4 y 6) se realizó por el test “t” de Student para muestras pareadas. Resultados en negrita indican coincidentes; el resto no coincidentes.

Tabla 2 - Media ± DS de los niveles de testosterona (TT) (ng/ml) evaluados en el grupo de pacientes con valores normales de TT por LC-MSMS por Cobas de acuerdo a ambos protocolos (estudio 1 y estudio 2).

	TT estudio1	Estudio 1 vs LC-MSMS (p)	Estudio 2 vs 1 (p)	TT estudio 2	Estudio 2 vs LC-MSMS (p)
Lab 6 n:36	0,244±0,043	0,0381	0,0337	0,289±0,117	0,3889
Lab 7 n:36	0,262±0,054	0,5442	0,8847	0,259±0,102	0,5788
Lab 8 n:36	0,291±0,050	0,1112	0,2890	0,270±0,118	1,0000
Lab 9 n:36	0,284±0,060	0,3256	0,7949	0,278±0,124	0,7285
Lab 10 n:36	0,253±0,044	0,1748	<0,0038	0,307±0,099	0,0592
Lab 11 n:32	0,300±0,099	0,1245	0,1862	0,350±0,200	<0,0240
LC-MSMS	0,270±0,060				

El estudio estadístico (columnas 3, 4 y 6) se realizó por el test “t” de Student para muestras pareadas. Resultados en negrita indican coincidentes; el resto no coincidentes.

Tabla 3 - Media ± DS de los niveles de testosterona (TT) (ng/ml) evaluados en el grupo de pacientes con valores aumentados de TT por LC-MSMS por Architect de acuerdo a ambos protocolos (estudio 1 y estudio 2).

	TT estudio1	Estudio 1 vs LC-MSMS (p)	Estudio 2 vs 1 (p)	TT estudio 2	Estudio 2 vs LC-MSMS (p)
Lab 1 n:34	0,920±0,270	0,4098	0,0636	0,978±0,443	0,2091
Lab 2 n:34	1,030±0,420	0,0632	0,7808	0,914±0,374	0,5360
Lab 3 n:36	0,998±0,404	0,1214	0,4242	0,924±0,394	0,4631
Lab 4 n:36	0,950±0,386	0,2974	0,3056	0,966±0,390	0,2231
Lab 5 n:31	1,010±0,420	0,1003	0,1765	0,948±0,407	0,2618
LC-MSMS	0,860±0,340				

El estudio estadístico (columnas 3, 4 y 6) se realizó por el test “t” de Student para muestras pareadas. Resultados en negrita indican coincidentes; el resto no coincidentes.

Tabla 4 - Media ± DS de los niveles de testosterona (TT) (ng/ml) evaluados en el grupo de pacientes con valores aumentados de TT por LC-MSMS por Cobas de acuerdo a ambos protocolos (estudio 1 y estudio 2).

	TT estudio1	Estudio 1 vs LC-MSMS (p)	Estudio 2 vs 1 (p)	TT estudio 2	Estudio 2 vs LC-MSMS (p)
Lab 6 n:36	0,770±0,325	0,2552	0,2914	0,856±0,360	0,9615
Lab 7 n:36	0,850±0,377	0,9063	0,4603	0,788±0,330	0,3500
Lab 8 n:36	0,880±0,379	0,8144	0,1564	0,760±0,330	0,2096
Lab 9 n:36	0,913±0,370	0,5289	0,3801	0,837±0,360	0,7813
Lab 10 n:36	0,834±0,358	0,7530	0,1848	0,953±0,395	0,2880
Lab 11 n:32	0,817±0,377	0,6129	0,5714	0,868±0,384	0,9257
LC-MSMS	0,860±0,340				

El estudio estadístico (columnas 3, 4 y 6) se realizó por el test “t” de Student para muestras pareadas. Resultados en negrita indican coincidentes; el resto no coincidentes.

Tabla 5 - Estudio estadístico de los resultados realizados por Architect en el grupo de mujeres con niveles aumentados de TT por LC-MSMS.

	Media	Varianza	Pearson	Estadístico t	p-valor
LC-MSMS Lab 1n: 34	0,6124 0,6640	0,1501 0,1636	0,9857	-4,393	0,00011
LC-MSMS Lab 2 n:34	0,6009 0,7359	0,1563 0,2227	0,9795	-6,769	1,02E-07
LC-MSMS Lab 3 n:36	0,5911 0,6936	0,1495 0,2031	0,9894	-6,396	4,270E-8
LC-MSMS Lab 4 n:36	0,5911 0,6642	0,1495 0,1810	0,9890	-6,123	5,32E-07
LC-MSMS Lab 5 n:31	0,6342 0,7610	0,1587 0,2234	0,9813	-6,294	6,10E-07

Tabla 6 - Estudio estadístico de los resultados realizados por Cobas en el grupo de mujeres con niveles aumentados de TT por LC-MSMS.

	Media	Varianza	Pearson	Estadístico t	p-valor
LC-MSMS Lab 6 n:36	0,5911 0,5320	0,1495 0,1318	0,9779	4,314	0,0001
LC-MSMS Lab 7 n:36	0,5911 0,5805	0,1495 0,1677	0,9871	0,941	0,3529
LC-MSMS Lab 8 n:36	0,5911 0,6097	0,1495 0,1690	0,9877	-1,663	0,1053
LC-MSMS Lab 9 n:36	0,5911 0,6244	0,1495 0,1774	0,9890	-2,901	0,0084
LC-MSMS Lab 10 n:36	0,5911 0,5707	0,1495 0,1590	0,9861	1,841	0,0741
LC-MSMS Lab 11n:32	0,6331 0,6631	0,1521 0,1636	0,9495	-1,336	0,1914

ecográfica ovárica (fig. 1-B). El criterio es hiperandrogenismo con anovulación crónica.

Adoptando el criterio de Rötterdam, son considerados SOP todos los fenotipos descriptos (fig. 1-C). Según este criterio, es posible el diagnóstico de SOP sin hiperandrogenismo (fenotipo J) así como pacientes ovulatorias (fenotipos C, F y H).

Según el criterio adoptado por la AES PCOS, no son consideradas SOP pacientes sin hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico, fenotipo J (fig. 1-D).

Es posible definir como SOP pacientes con resultados positivos para uno de los criterios de disfunción ovárica sin

que presenten otros excesos de andrógenos o patologías relacionadas tales como: disfunción tiroidea, hiperprolactinemia, hiperplasia adrenal no clásica (CYP21), Síndrome de Cushing, Neoplasmas Secretores de Andrógenos y HAIR – AN.

Según el criterio NIH 1990, se considera SOP los fenotipos A, B, D, E, G y H. El uso de este criterio no evalúa la imagen

hiperandrogenismo clínico pero con niveles aumentados de andrógenos (fenotipos G, H e I) o con niveles androgénicos normales pero con hiperandrogenismo clínico (fenotipos D, E y F).

El comité de expertos del NIH elaboraron un documento (*Final Report National Institute of Health. Evidence - based methodology. Workshop on Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), diciembre 3-5/2012* <https://prevention.nih.gov/docs/programs/pcos/FinalReport.pdf>) cuyos principales resultados han sido resumidos y comunicados recientemente⁸. De acuerdo con este criterio se recomienda mantener el criterio más amplio del consenso de Rötterdam pero focalizando la necesidad para la identificación del fenotipo en cada paciente, resultando la identificación en cuatro fenotipos posibles:

1. Hiperandrogenismo clínico (HC) y/o bioquímico (HB) y anovulación crónica (AC).
2. HC y/o HB y ovarios poliquísticos (OP) pero con ciclos ovulatorios.
3. AC y OP sin HC o HB.
4. HC y/o HB, AC y OP.

Es posible definir como SOP pacientes con resultados positivos para uno de los criterios de disfunción ovárica sin hiperandrogenismo clínico pero con niveles aumentados de andrógenos (fenotipos G, H e I) o con niveles androgénicos normales pero con hiperandrogenismo clínico (fenotipos D, E y F o fenotipos 1), 2) y 4) del consenso NIH 2012). De lo expresado anteriormente surge la importancia de que la determinación de TT sea realizada por una técnica validada para evitar que falsos positivos o negativos modifiquen la fenotipificación de pacientes con SOP.

La definición de la imagen de ovarios poliquísticos ha sido parcialmente modificada recientemente. El estudio realizado por el Grupo de Tareas de la Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society (AES-PCOS), estudiando un grupo control vs SOP con métodos estadísticos apropiados, convergen hacia el valor umbral para considerar un incremento del número de folículos por ovario a ≥ 25 folículos en mujeres de 18-35 años, mientras que mantienen el criterio del volumen ovárico de ≥ 10 ml. Este grupo usando el número de folículos por ovario a ≥ 25 folículos para la definición de la morfología ovárica del SOP recomienda que deba realizarse con tecnología de ultrasonido de alta definición con un transductor de frecuencia de ≥ 8 MHz. De no disponer de esta aparatología sugieren usar el volumen ovárico⁹.

Por este consenso, al no dividir en fenotipos que presenten solamente hiperandrogenismo clínico o bioquímico agrupándolos como hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico, resulta difícil la comparación con el criterio de los fenotipos de Rötterdam.

El **fenotipo 1** según NIH-2012 corresponde a los fenotipos B, E y H según los criterios de Rötterdam.

El **fenotipo 2** ovulatorio, según criterio del NIH-2012, correspondería a los C, F e I de Rötterdam.

El **fenotipo 3** (NIH-2012) sin hiperandrogenismo correspondería al fenotipo J de Rötterdam.

El **fenotipo 4** según criterio de NIH-2012 a los fenotipos A: hiperandrogenismo clínico y bioquímico; D: hiperandrogenismo clínico, y G: hiperandrogenismo bioquímico; los 3 subgrupos con alteraciones del ciclo menstrual y ovarios poliquísticos.

La complejidad del diagnóstico de SOP desde su denominación a su correcta tipificación es actualmente motivo de preocupación. En cuanto a la denominación de ovarios poliquísticos, Andrea Dunaif y Carles Kettering (http://education.questdiagnostics.com/presentations/from-distraction-to-traction-redefining-polycystic-ovary-syndrome-pcos-as-a-major-metabolic-disorder?presentation_id=370) postulan que el

SOP es una definición inapropiada debido a que los autores consideran que no son quistes sino estructuras realmente normales de los folículos ováricos, los cuales contienen ovocitos en proceso de maduración. Debido a un desbalance hormonal, la maduración de esos folículos se detiene en un tamaño aproximado de 10 mm. Se observa un incremento en el número de estos folículos aunque no están debidamente aclaradas las razones de este fenómeno. Se plantea en el futuro una reunión para tratar de definir apropiadamente esta patología.

Las distintas sociedades científicas en reuniones de consenso de expertos en el tema, trataron de unificar los criterios en la definición y métodos que permita una fenotipificación apropiada que a su vez facilite una terapéutica adecuada. Diferentes guías, elaboradas entre otras por la Sociedad Europea de Endocrinología; la Asociación Americana de Clínicos Endocrinólogos; la Sociedad Australiana de Endocrinología y la Endocrine Society, han sido publicadas donde plantearon como muy importante resolver aspectos relacionadas a métodos diagnósticos, particularmente la cuantificación de andrógenos, aspectos relacionados al SOP en la adolescencia y menopausia, y cuál o cuáles fenotipos son los de mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, estado inflamatorio o enfermedad cardiovascular¹⁰⁻¹³.

Respecto a la disfunción ovulatoria ha sido comunicado un criterio con algunas modificaciones; a saber:

- Oligomenorrea son ciclos de más de 35 días pero menos de 6 meses.
- Pacientes en amenorrea, aquellas con falta de menstruación por 6 a 12 meses luego que se haya establecido un patrón cíclico¹⁴. Ovario poliquístico se define según el criterio del comité de expertos del NIH quienes elaboraron el *Final Report National Institute of Health. Evidence - based methodology. Workshop on Polycystic Ovary Syndrome, diciembre 3-5/2012*.

Se ha postulado que para el diagnóstico de SOP, uno o ambos de los criterios de ovarios poliquísticos o de disfunción ovárica son suficientes¹⁵.

B) Hiperandrogenismo bioquímico

Los marcadores bioquímicos para definir el hiperandrogenismo bioquímico son la TT, TL, DHEAs, A4 y de relevancia para el cálculo de la TL la SHBG, también como posible biomarcador de Resistencia a la Insulina (RI).

Testosterona total

La TT es el andrógeno de mayor concentración circulante y es el recomendado de primera elección para la evaluación del exceso de andrógenos en la mujer. Sin embargo se ha comunicado una considerable sobreposición de los niveles de TT en hirsutas con los valores obtenidos comparativamente en mujeres normales. Esto probablemente sea debido en parte a la falta de sensibilidad entre los diferentes kits comerciales. La mayoría de los laboratorios realizan la determinación de TT con kits comerciales empleando suero total sin extracción, los cuales resultan de escasa exactitud, particularmente en los valores obtenidos en mujeres normales.

Numerosos inmunoensayos reportan valores significativamente diferentes a los obtenidos empleando cromatografía gaseosa acoplada con espectrometría de masa (GC-MS) o cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masa (LC-MS/MS), metodología que ha sido recomendada como *gold standard* para la evaluación de esteroides.

Numerosas publicaciones demostraron que los métodos manuales o automatizados resultaron de baja performance para la determinación de TT a concentraciones baja de la

hormona. Entre otras, las seleccionadas en esta revisión corresponden a las citas 16-21. Sin embargo en la literatura existen numerosas otras publicaciones en el mismo sentido y con la misma seriedad científica, no comunicadas en esta publicación solo por razones de espacio. Swerdloff resume la evolución de las diferentes metodologías para la evaluación de los esteroides sexuales (<http://education.questdiagnostics.com/insights/65>).

Etapa inicial: Los inmunoensayos con anticuerpos por ejemplo RIA y ELISA, en principio manuales y luego los automatizados, permitieron resultados rápidos y baratos, pero en desmedro de la calidad, exactitud, precisión y reproducibilidad de los mismos.

Clínicamente, el método debe ser reproducible y específico. Los inmunoensayos presentan gran variabilidad intra e inter laboratorios, especialmente a niveles bajos, en particular los esteroides en mujeres, hombres hipogonádicos y prepúberes. La especificidad depende del anticuerpo usado. Idealmente no debería reconocer moléculas de estructuras parecidas o isómeras; por ejemplo, un anticuerpo de TT ideal, no debería reconocer la epiT, 5 α o 5 β DHT u otras sustancias estructuralmente relacionadas.

Etapa actual: LC tándem MS-MS. Muy preciso y exacto. Elimina las proteínas y puede separar la T de otros compuestos de estructura similar de la muestra.

Consenso del Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'s Hormone Standardization Project (CDC-HoST Program). https://www.cdc.gov/labstandards/pdf/hs/Testosterone_Protocol.pdf

El Laboratorio de Ciencias del Centro Nacional de Salud Ambiental (USA) en consenso con los principales referentes de los inmunoensayos por numerosas publicaciones que demostraron las dificultades para determinar TT, especialmente las importantes diferencias entre las distintas técnicas, planificó un proyecto de estandarización, en base a la siguiente guía:

- Establecer un calibrador común (estándar primario).
- Especificar la matriz de cada kit comercial para calibrar los ensayos.
- Referir la técnica respecto a un método de referencia (El goal estándar para la calibración de los métodos en CDC: LC-MSMS).

CDC reúne un conjunto de expertos en un esfuerzo para armonizar los ensayos, a efectos de que el resultado para una hormona sea el mismo en los distintos laboratorios con los mismos o diferentes métodos pero que hayan calificado en este programa.

Actualmente algunos fabricantes de reactivos en los insertos de sus kits de determinación de TT establecen que su método está referido a los resultados obtenidos por LC-MSMS o que en su momento fue validado por CDC.

Bajo este nuevo concepto, decidimos realizar un nuevo estudio comparando métodos convalidados y no convalidados por CDC²⁰.

Evaluamos los niveles de TT en 11 mujeres normales y 12 hirsutas cuyos criterios de inclusión o exclusión fueron previamente publicados²². En todas las muestras individuales de ambos grupos se evaluó TT por LC-MSMS (laboratorio Quest USA) y por los siguientes kits comerciales, algunos de ellos utilizados por más de 1 laboratorio: **Architect 2G** (laboratorio Abbott) método validado por LC-MSMS, **Cobas 411** (laboratorio Roche) metodología validada por CDC. Los restantes kits comerciales utilizados en este estudio refieren en sus respectivos insertos las características del perfil de calidad de sus ensayos pero no están validados o calibrados

por LC-MSMS: **RIA** Immunotech, **Access**, **Centauro** e **Immulate**.

La determinación de TT por LC-MSMS demostró que todos los valores en el grupo control fueron normales. En el grupo de mujeres hirsutas, 2 de las 12 pacientes tenían niveles de TT normales, en las restantes los valores fueron superiores al nivel de corte superior al método de referencia.

Respecto a las pacientes hirsutas se obtuvieron falsos positivos en uno o en los dos casos con valores de TT normal por LC-MSMS en los kits de Centauro, Immulate, RIA y Access. No se obtuvieron falsos positivos por Architect y Cobas. Nótese que estos dos últimos métodos fueron calibrados por LC-MSMS o validados por CDC, reforzando el concepto de la necesidad de normatizar la calibración de los métodos por LC-MSMS. En ninguno de los métodos se obtuvieron falsos negativos en el grupo de hirsutas.

El empleo de métodos automatizados o manuales requiere que la tecnología a emplearse esté validada contra un método *gold standard*, una posibilidad es hacerlo en el CDC. Es muy dificultoso que cada laboratorio valide en CDC el método que utiliza. Al emplear kits comerciales, los fabricantes de los mismos son quienes deberían validar su metodología. Ante esta situación estudiamos una manera indirecta de validar los métodos empleados. Utilizamos el criterio de aceptabilidad del CDC, que especifica que el bias en un número apropiado de muestras con concentraciones desde niveles de prepúberes hasta de hombres normales sea de $\pm 6,4\%$ del bias del método de referencia (LC-MSMS), junio 2016 (http://www.cdc.gov/labstandards/pdf/hs/CDC_Certified_Testosterone_Procedures.pdf)

Como hemos referido en el párrafo anterior, en este estudio empleamos una validación indirecta en niveles de TT determinados por LC-MSMS de 0,15 a 1,75 ng/ml. Calculamos el bias de cada laboratorio con su método y lo comparamos con el obtenido en las mismas muestras, determinando la TT por LC-MSMS, realizado por Quest Diagnostics, método validado en CDC en mayo del 2012 y revalidado anualmente hasta el presente. Los resultados obtenidos demostraron que los métodos de Roche y Abbott cumplieron satisfactoriamente los requisitos de validación en el grupo de mujeres hirsutas. Bias 2,3; 4,6 y 14,7 para Abbott y -6,4; -3,0; -8,5 y 18,9 para Roche. Los demás métodos no cumplieron los requisitos de aceptabilidad. En el grupo control, ninguno de los métodos cumplió satisfactoriamente el criterio de performance según la aceptabilidad para la validación del CDC²².

De modo que con niveles inferiores a 0,5 ng/ml, valor límite superior en mujeres normales, los resultados aunque aceptables presentan una gran variabilidad. A pesar de que resulta promisorio la performance de los kits de Abbott y Roche, los mismos presentan variabilidad entre laboratorios que los utilizan.

Actualmente estudiamos la variabilidad entre el mismo método en diferentes laboratorios, focalizado en la posibilidad de que estas diferencias pudieran deberse a diferentes lotes, errores en la calibración o problemas inherentes al equipo.

Estas variables fueron los objetivos de este estudio tendiente a tratar de uniformar los resultados por lo menos en los dos fabricantes de kits con mejor performance. Se evaluaron alícuotas del mismo suero preparado por duplicado de 40 mujeres para determinar por los reactivos de Abbott (5 laboratorios) y Roche (6 laboratorios), en dos diferentes estudios:

- Por la técnica que habitualmente emplean los laboratorios, y
- Empleando de cada fabricante el mismo lote del kit calibradores y controles.

Una alícuota de cada suero fue enviada a Quest para la valoración de TT por LC-MSMS.

Parámetros a definir para cada paciente											National Institute of Health (NIH) 1990											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
HA clínico	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	HA clínico	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
HA bioquímico	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	HA bioquímico	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
DO	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	DO	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Imagen OP	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	Imagen OP	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
HA: Hiperandrogenismo DO: Disfunción Ovárica OP: Ovario Poliquístico											HA: Hiperandrogenismo DO: Disfunción Ovárica OP: Ovario Poliquístico											
Consenso Rotterdam 2003											Posición de la Androgen Excess Society											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
HA clínico	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	HA clínico	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
HA bioquímico	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	HA bioquímico	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
DO	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	DO	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Imagen OP	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	Imagen OP	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
HA: Hiperandrogenismo DO: Disfunción Ovárica OP: Ovario Poliquístico											HA: Hiperandrogenismo DO: Disfunción Ovárica OP: Ovario Poliquístico											

Figura 1 - Diversos parámetros clínicos y bioquímicos para el diagnóstico de SOP (arriba izquierda). Sobre la base de esos parámetros, diversos consensos establecieron diferentes fenotipos (consensos identificados en la figura). Los criterios de cada uno de ellos resultan de la combinación de diversos parámetros que se circulan en rojo.

Los valores obtenidos por LC-MSMS permitieron dividir a las mujeres estudiadas en dos grupos:

- Con valores normales de TT.
- Con valores aumentados de TT.

Los estudios estadísticos de los resultados de ambos métodos fueron realizados comparativamente a LC-MSMS²³.

Los resultados obtenidos por LC-MSMS en el grupo a) valores normales de TT (media ± DS ng/ml) 0,27 ± 0,06 y en el grupo b) valores aumentados de TT (media ± DS ng/ml) 0,86 ± 0,34. Los resultados obtenidos en esas mismas muestras en los laboratorios que usaron el kit de Abbott o el de Roche en los dos estudios se muestran en las figs. 2 y 3 y en las tablas 1 a 4.

Es posible concluir de estos estudios que en mujeres normales con niveles de TT menor a 0,5 ng/ml ni Architect ni Cobas fueron totalmente aceptables. Debe destacarse que tanto en el estudio 1 como en el 2, los resultados fueron no coincidentes con LC-MSMS. Sin embargo, los valores obtenidos fueron coincidentes entre los dos estudios efectuados en cada laboratorio y no se obtuvieron casos de falsos positivos.

Los resultados realizados con Cobas, a niveles más bajos de TT se obtuvieron con una menor desviación que Architect respecto a LC-MSMS. Sin embargo en dos laboratorios se obtuvieron resultados no coincidentes. Los resultados con el test "t" de Student fueron coincidentes con los obtenidos con el bias de cada laboratorio respecto a LC-MSMS.

En síntesis, a niveles normales de TT, todos los laboratorios que usaron Abbott son significativamente diferentes respecto al método de referencia según el análisis de varianza y el coeficiente de correlación de Pearson. El estudio por bias evidencia un sesgo positivo; todos dieron resultados más altos que LC-MSMS. Con los mismos parámetros evaluados con Roche, 4 de los 6 laboratorios arrojaron resultados coincidentes con el método de referencia (p >0,05). Dos laboratorios que presentaron resultados significativamente diferentes con LC-MSMS, laboratorios 6 y 9, presentaron bias superior al límite de aceptabilidad (figs. 4, 5 y 6 y tablas 5 y 6).

Los resultados del segundo estudio para ambos kits no fueron significativamente diferentes de los del primer estudio tanto para valores de TT normales como aumentados, indicando que las diferencias entre los valores obtenidos no parecería depender de distintos lotes de los kits, calibradores, controles empleados o servicio técnico de los equipos previos a las determinaciones²³.

Para niveles de TT superiores a 0,5 ng/ml, ambos métodos resultaron totalmente aceptables.

Por todo lo mencionado anteriormente en la evaluación de TT para el diagnóstico de los diferentes fenotipos del SOP, adquiere singular importancia la exactitud en los resultados obtenidos, que dependerá de la metodología utilizada. Avalan este concepto diversas circunstancias, tales como:

- Emplear métodos validados cuando el laboratorio informa niveles aumentados de TT.

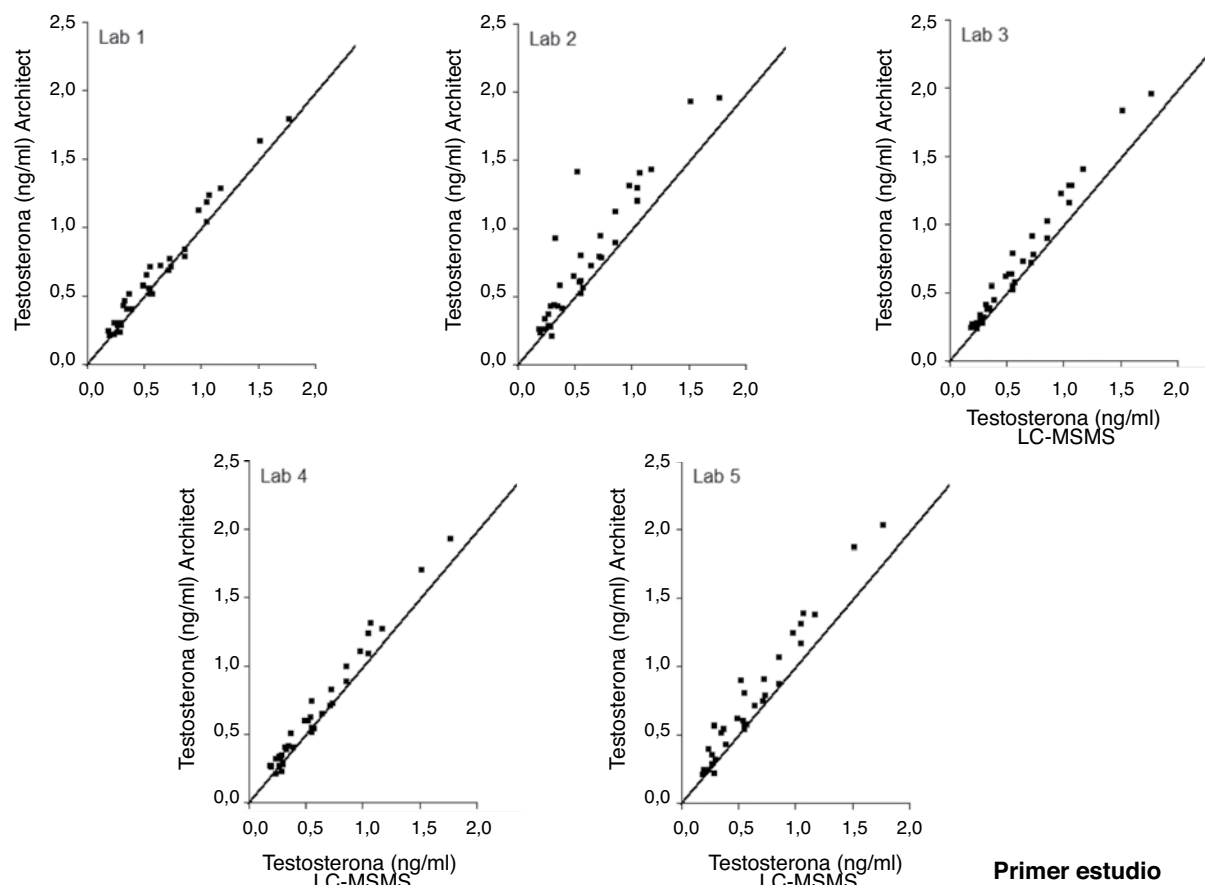


Figura 2 - Relación entre los niveles de Testosterona determinados por 5 laboratorios que usaron el kit 2nd G de Abbott y los niveles del andrógenos en las mismas muestras determinados por LC-MSMS.

- Emplear métodos validados para definir la concentración de TT, indispensable para realizar el cálculo correcto de la TL y/o de la Tbio.
- La utilidad de la TT en la correcta tipificación de pacientes con SOP.

Este último punto es fundamental. Tomemos como base la nueva fenotipificación en 4 grupos de paciente con SOP.

Si en los grupos 1 o 2, las pacientes que no presentan hirsutismo o que solo presentan una imagen de ovarios poliquísticos y la evaluación de TT se encuentra erróneamente en el rango normal, estas pacientes no serán fenotipificadas como SOP. Corresponderían erróneamente a anovulatorias. Si en pacientes del grupo 3 sin hirsutismo, los niveles de TT informados erróneamente normales se encontraban aumentados, estas pacientes no pertenecerían al grupo 3 sino al 4. La misma situación sería a la inversa: paciente sin hirsutismo del grupo 4 con niveles erróneamente aumentados de TT deberían corresponder al grupo 3.

Estos casos inducirían una sobre o deficiente identificación de pacientes con SOP conllevando una posible acción terapéutica no apropiada.

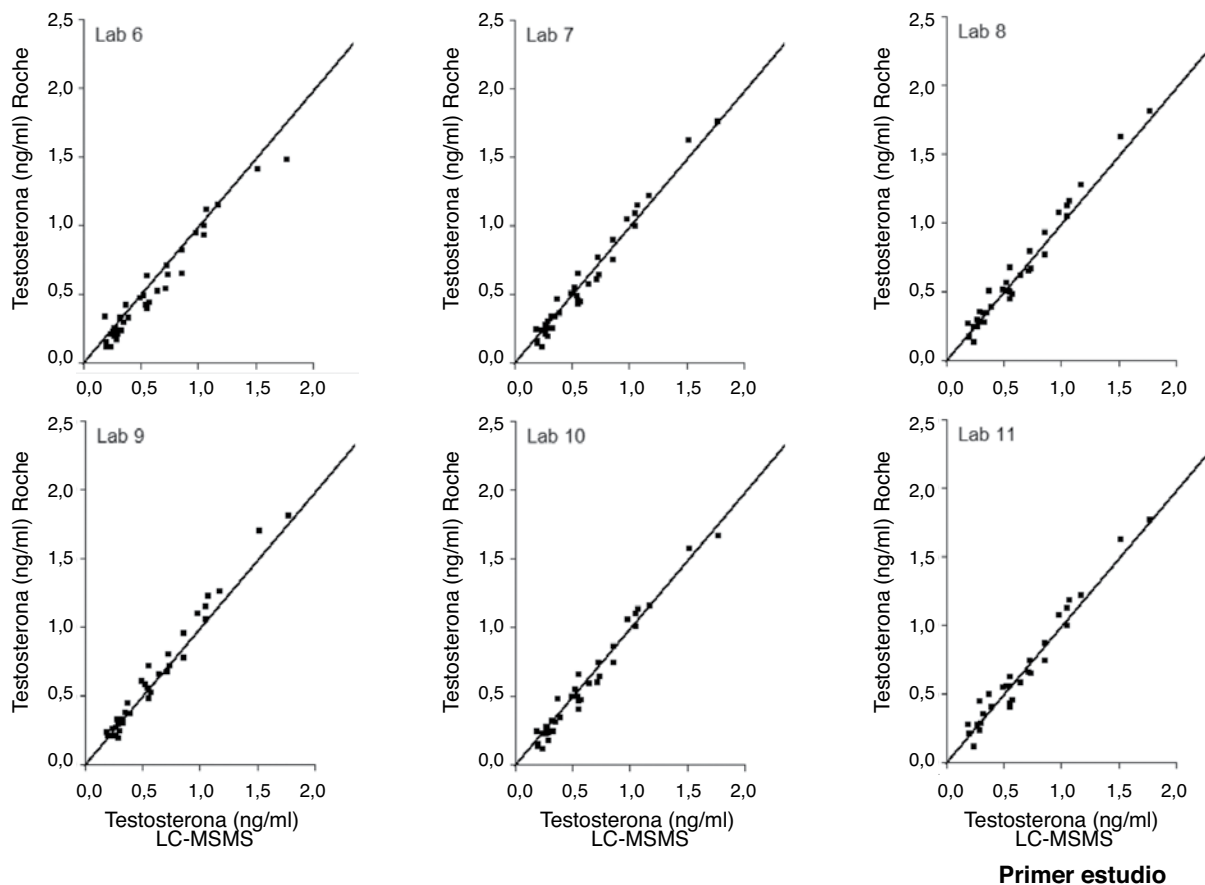
Testosterona libre

La TT circula unida a proteínas de transporte, siendo la SHBG y la Albúmina las que han sido mayormente estudiadas. La TT se une a la SHBG con una constante de afinidad (K_a)

de $1,6 \times 10^9 M^{-1}$ y a la Albúmina con K_a de $10^4 M^{-1}$, vale decir 100.000 veces menor. La K_a es inversamente proporcional a la velocidad de disociación del complejo TT: proteína de transporte siendo $>$ de 20 segundos y $<$ de 20 segundos, para la SHBG y la Albúmina, respectivamente. Una porción de la TT circula sin unirse a las proteínas y constituye la fracción TL. Dado que 20 segundos es el tiempo de transporte para que una molécula pase de un vaso aferente a un capilar, la TL y la TT unida a la albúmina son capaces de entrar en un órgano, que si tiene receptores para ese esteroide, será un órgano blanco donde la TT ejercerá su acción biológica. En síntesis, una parte de la TL y el remanente de la TL + la unida a la albúmina, fracción biodisponible (Tbio) constituyen las fracciones biológicamente activas de la TT. Los niveles de TL y de Tbio dan la misma información fisiopatológica del nivel de acción androgénica debido a que ambas fracciones dependen directamente de la concentración de SHBG.

La determinación de la TL ha sido intentada por RIA empleando análogos isotópicamente marcados, sin embargo estos métodos están totalmente descartados debido a que sus resultados no son comparables con los obtenidos con el método *gold standard*²⁵⁻²⁶.

El índice de Andrógenos Libre (IAL) calculado como la relación entre la TT y la SHBG posiblemente sea la valoración más sensible para la evaluación del hiperandrogenismo en el SOP⁷. También es posible calcular la TL y Tbio adaptando la ecuación de la Ley de Masa²⁷.



Primer estudio

Figura 3 - Relación entre los niveles de Testosterona determinados por 6 laboratorios que usaron el kit de Roche en el equipo Cobas y los niveles del andrógeno en las mismas muestras determinados por LC-MSMS.

Resultados comparativos de Testosterona por 3 diferentes métodos en diferentes laboratorios
 LC-MSMS: Laboratorio Quest USA; Abbott: 5 laboratorios; Roche: 6 laboratorios

Primer estudio

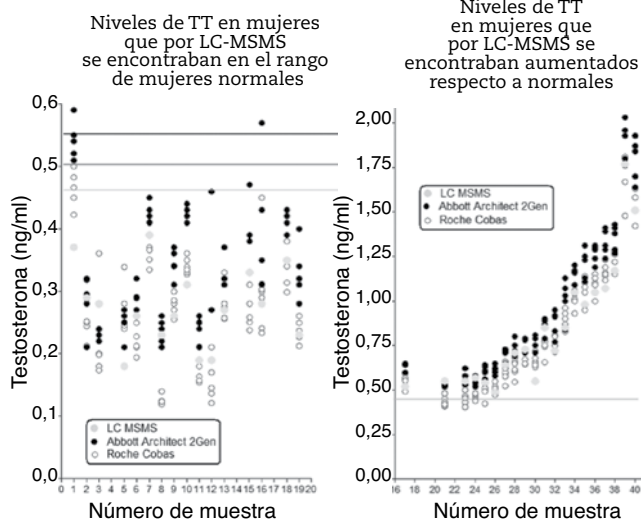


Figura 4 - Resultados comparativos de Testosterona por 3 diferentes métodos: LC-MSMS en el Laboratorio Quest USA; por el kit de Abbott en 5 laboratorios, y por Roche en 6 laboratorios, según el protocolo 1, donde cada laboratorio tanto por Abbott como por Roche emplearon diferentes lotes de calibradores y controles y para Abbott también diferentes lotes de reactivos.

La evaluación de la SHBG resulta de importancia en el hiperandrogenismo cuando presenta niveles normales de TT debido a que por disminución de la SHBG se incrementa la TL generando solamente con la valoración de TT, resultados falsos negativos.

La situación inversa se produce cuando el aumento de TT se debe al aumento de la proteína transportadora, por tratamientos con anticonceptivos hormonales o con hormonas tiroideas, En esos casos, su valoración es fundamental dado que con solo la TT podrían obtenerse falsos positivos pero determinando la SHBG y con el cálculo de la TL, estos resultan normales. En ambas circunstancias podrían fenotipificarse erróneamente a pacientes con SOP.

Una situación muy importante, particularmente en pacientes con SOP, es que la SHBG resulta un marcador significativo de resistencia a la insulina (RI) que a su vez induce incremento de andrógenos, pudiendo predecir la susceptibilidad al síndrome metabólico (SMe)²⁸⁻³¹. El sobrepeso y la obesidad son factores determinantes en la disminución de la SHBG debido al exceso de grasa corporal³².

Ha sido descrito un polimorfismo en el gen que codifica a SHBG que reduce los niveles de la proteína independientemente de la RI y de la obesidad³³⁻³⁴.

DHEAs y Androstenediona (A4)

La determinación de la DHEAs resulta de utilidad como índice de la participación adrenal en el hiperandrogenismo bioquímico del hirsutismo, debido a que en tejidos periféricos puede localmente convertirse en andrógenos de actividad

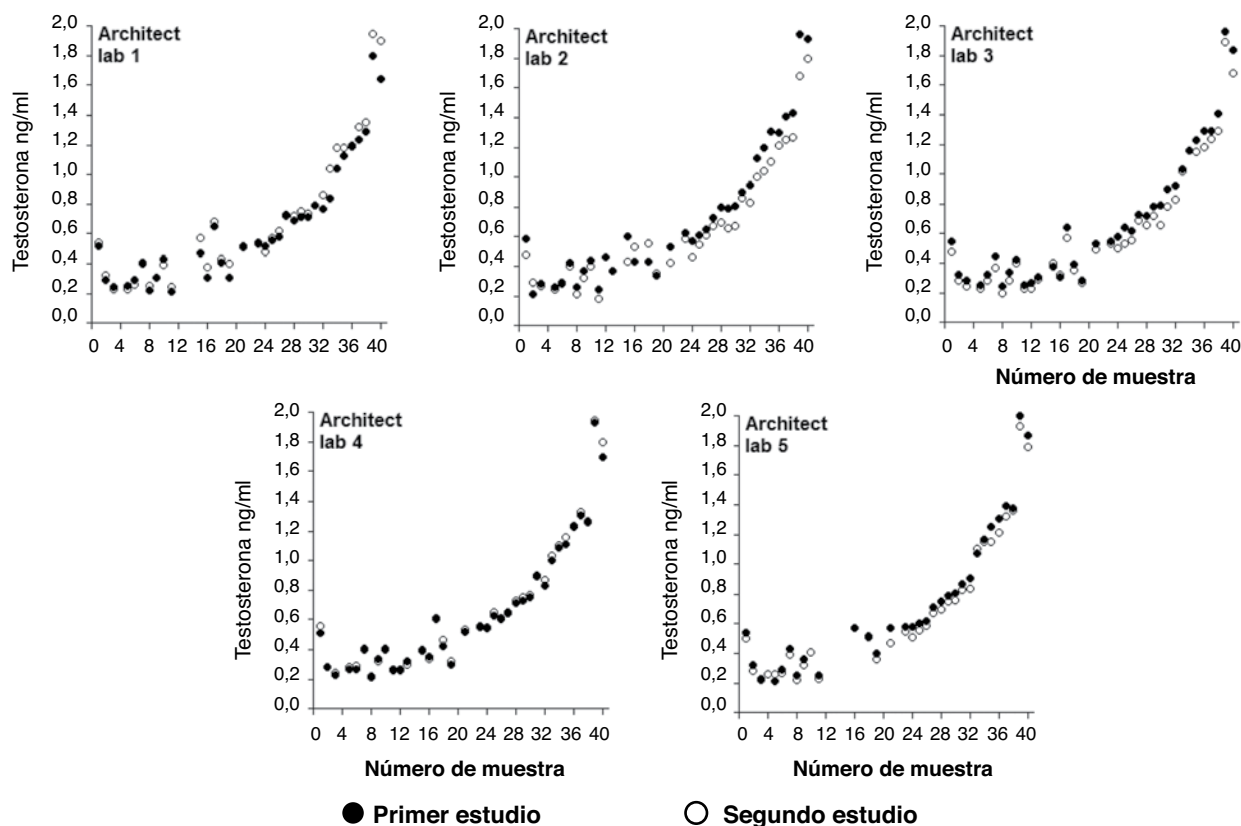


Figura 5 - Resultados comparativos de los 2 protocolos en cada muestra en los 5 laboratorios que usaron el método de Abbott. En el primer estudio cada laboratorio empleó diferentes kits de reactivos, calibradores y controles, y en el segundo estudio los 5 laboratorios emplearon los mismos reactivos, controles y calibradores; además previo a la realización del segundo estudio se realizó un mantenimiento del equipo por parte del personal técnico de la empresa Abbott.

biológica.

La A4 con la metodología que disponemos rutinariamente no ha demostrado que haya sido categóricamente de utilidad como marcador periférico de hiperandrogenismo. Es posible que en el futuro, puedan estudiarse los precursores evaluados por LC-MSMS por técnicas validadas por CDC y puedan ser de utilidad como marcadores de un subtipo de hiperandrogenismo³⁵.

En síntesis, el método de elección para evaluar TT es LC-MSMS particularmente para valores bajos del andrógeno, además por la exactitud debido a que no está influenciada por reacciones cruzadas con otros esteroides. Keefe y col.³⁶ determinaron simultáneamente 13 esteroides en una misma muestra de sangre por LC-MSMS y compararon los resultados por RIA. Las conclusiones de ese estudio demuestran que LC-MSMS fue superior al RIA en A4, progesterona y 17 OH Progesterona, y los resultados por ambos métodos fueron superiores en SOP que en normales. La TT fue similar por ambos métodos, y los resultados también fueron superiores en pacientes con SOP. No se obtuvieron diferencias en Cortisol, Corticosterona, y sus precursores 11 desoxi y también la DHEAs entre mujeres con o sin SOP.

Otros autores obtienen resultados similares estudiando diversos esteroides por LC-MSMS, coincidiendo que por RIA los valores son mayores. En niveles bajos de TT recomiendan utilizar LC-MSMS para evaluar este andrógeno³⁷.

Handelsman y col.³⁸ evalúan simultáneamente por LC de alta presión en tándem con MSMS: TT, DHT, DHEA, A4

estradiol, estrona, 17 OH Progesterona, Progesterona y Cortisol. Determinan TT por inmunoanálisis de quimioluminiscencia de Beckman Coulter, y SHBG por Immulite. Calculan el IAL y el índice de andrógenos totales (IAT) representa el valor de TT + 5 veces el de Dihidrotestosterona. Por RIA, los valores obtenidos fueron significativamente superiores a los de LC-MSMS. Por todos los modelos de multivariados, el IAT y el IAL tuvieron la mejor discriminación entre mujeres con o sin SOP (81-86%), con alta sensibilidad (92-96%) pero baja especificidad (28-43%).

Nuestro grupo comparó dos inmunoensayos versus LC-MSMS, pero no con el objetivo de poder discriminar paciente con o sin SOP. Nuestro objetivo fue evaluar analíticamente los resultados de esos dos métodos con respecto a LC-MSMS. Los resultados obtenidos en el estudio de Handelsman y col.³⁸, con los mismos objetivos, aún desde el punto de vista analítico, son difíciles de evaluar comparativamente con los obtenidos por nuestro grupo, dado que los inmunoensayos fueron distintos y LC-MSMS utilizado por Handelsman y col. fue un método desarrollado, y no refieren haberlo validado por CDC. A pesar de estas limitaciones, sus conclusiones resultan similares a las nuestras, en el sentido de que se obtuvieron diferencias en los valores absolutos entre ambas metodologías.

Nuestros resultados deberán ser corroborados, evaluando para estos ensayos inmunológicos, la capacidad de discriminación entre pacientes con o sin SOP y definir en ese sentido la precisión, especificidad y sensibilidad en estos aspectos.

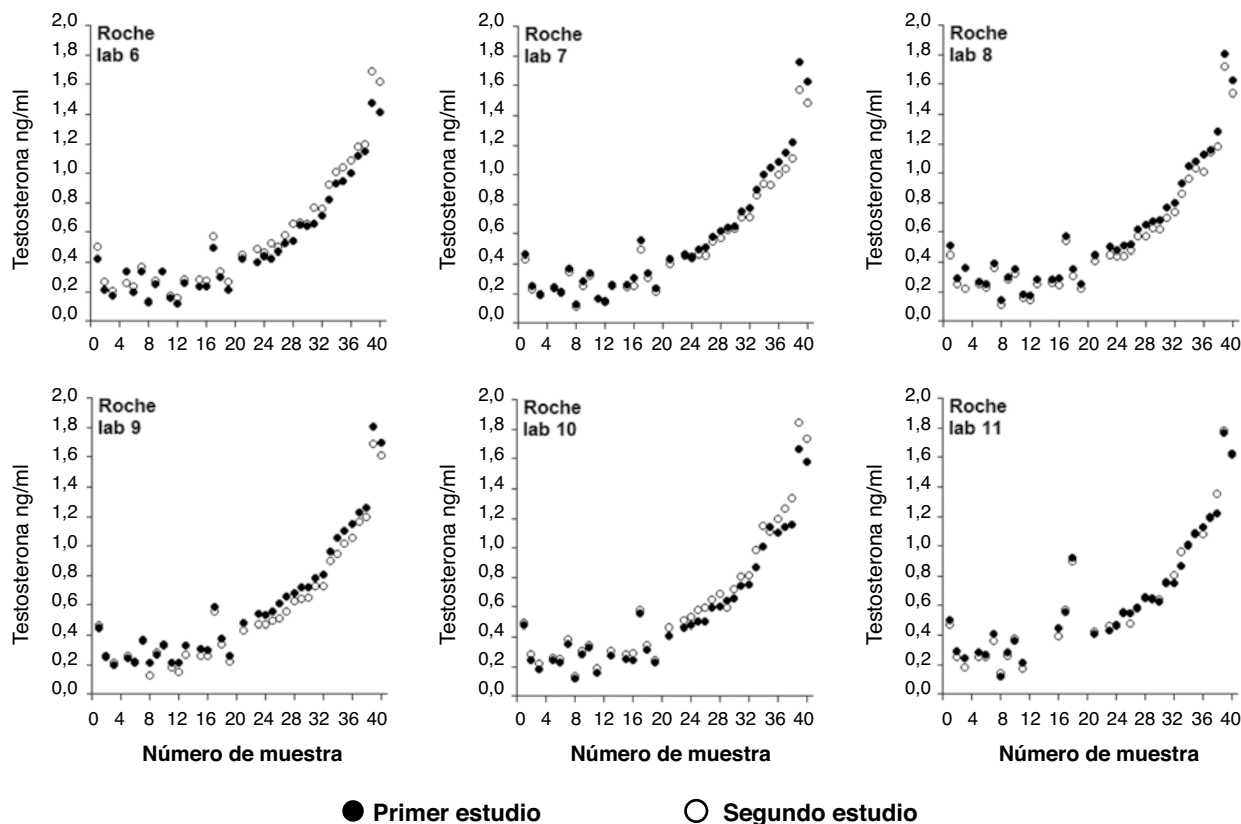


Figura 6 - Resultados comparativos de los 2 protocolos en cada muestra en los 6 laboratorios que usaron el método de Roche. En el primer estudio cada laboratorio empleó diferentes kits de calibradores y controles, y en el segundo estudio los 6 laboratorios emplearon los mismos reactivos, controles y calibradores; además previo a la realización del segundo estudio se realizó un mantenimiento del equipo por parte del personal técnico de la empresa Roche.

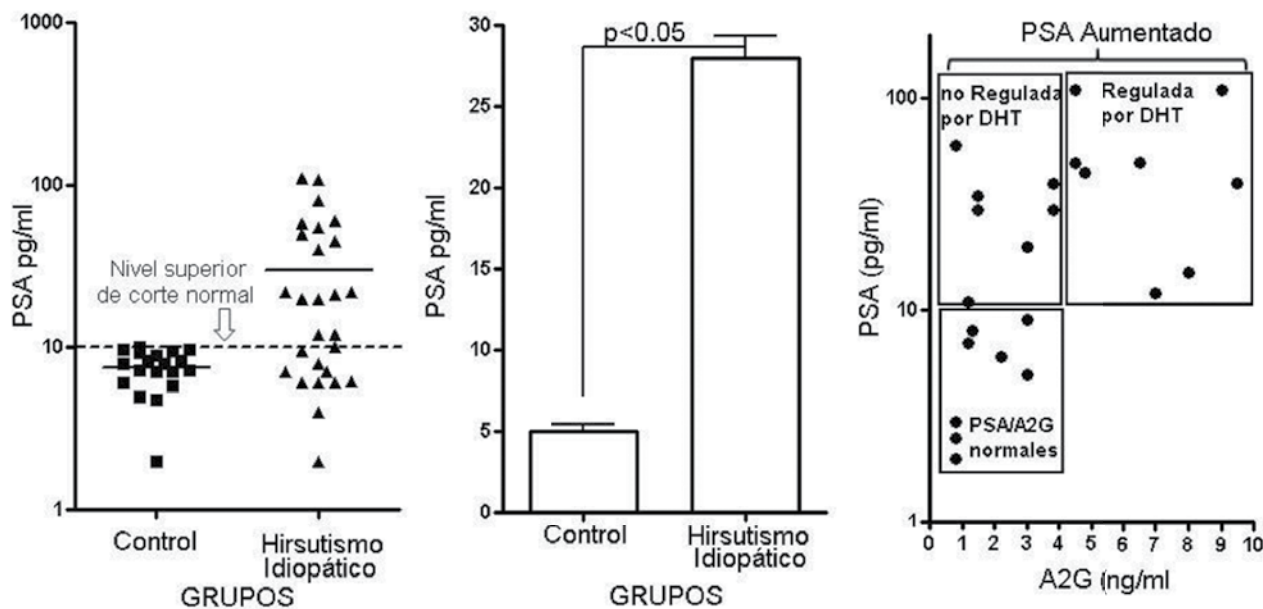


Figura 7 - Niveles de antígeno prostático específico (PSA) determinado por un método ultrasensible en mujeres normales y en pacientes hirsutas (parte izquierda de la diapositiva). En la parte central se muestra la media \pm DS en ambos grupos. A la derecha se grafica la relación entre los niveles de PSA respecto al glucuronidato de androstanodiol (A2G) como expresión de la actividad androgénica periférica de la Dihidrotestosterona.

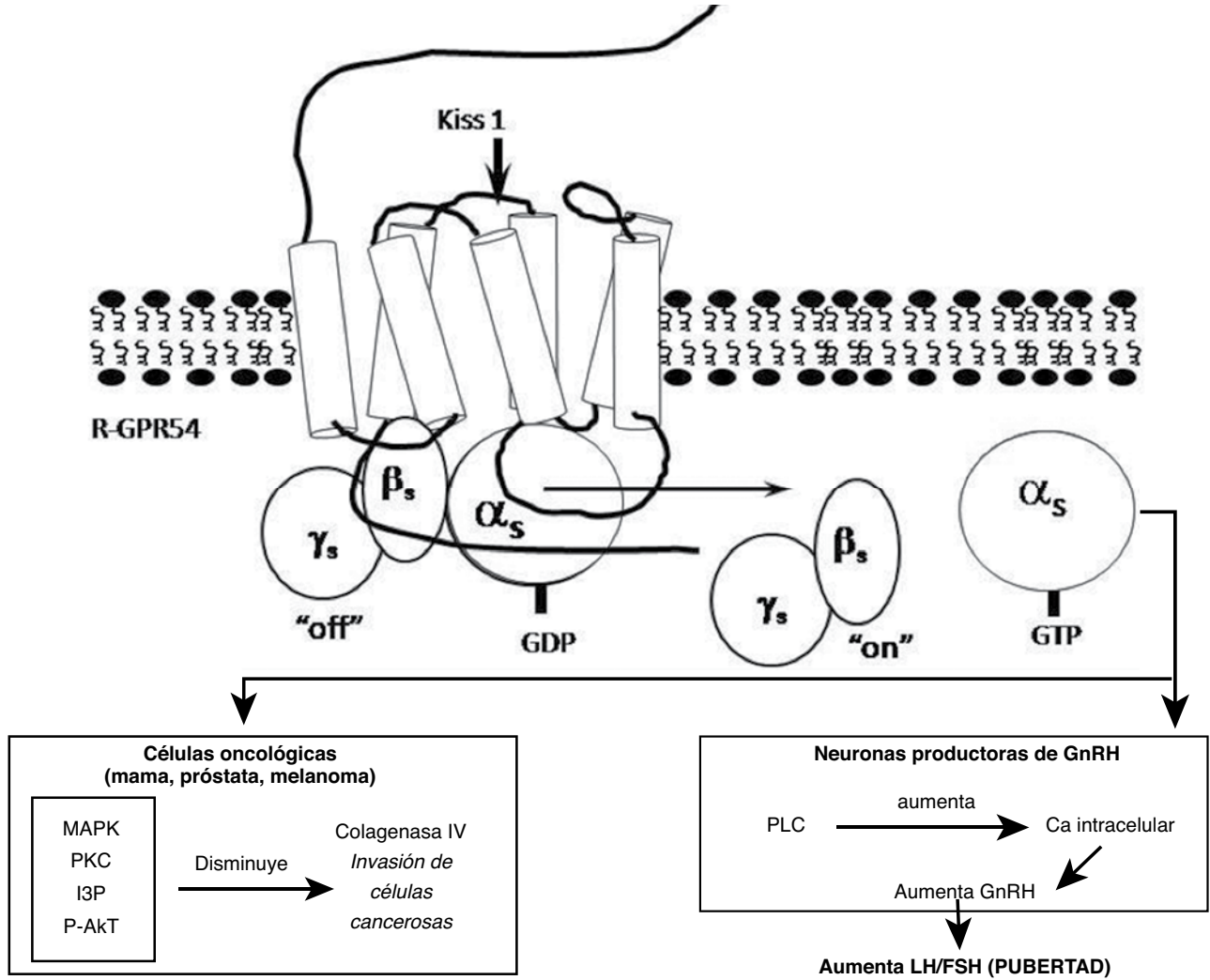


Figura 8 - Esquema del mecanismo de acción de la Kiss-1 (Metastatina o Kisspeptina) en las células oncológicas mediado a través de su receptor, R-GPR54, activando la proteína G, liberando la subunidad alfa, generando su respuesta (parte superior de la gráfica), activando la mapkinasa (MAPK), fosfoquinasa C (PKC), inositol 3 fosfato (I3P) y la fosfo Akt (P-Akt), inhibiendo la colagenasa IV (parte inferior-izquierda). Por otro lado, activa la fosfolipasa C (PLC), incrementando el calcio intracelular, generando una liberación de GnRH y como consecuencia un aumento de LH y FSH en la pubertad.

C) Estudios adicionales del laboratorio de utilidad en el diagnóstico de SOP

1) Hormona anti Mülleriana

La hormona anti Mülleriana (AMH) es la sustancia inhibidora de los conductos de Müller, descubierta por Jost y col. en 1947³⁹. Es producida en los fetos masculinos (46 XY) por las células de Sertoli desde la diferenciación testicular antes de finalizar la semana 9 de amenorrea. Provoca la regresión irreversible de los conductos de Müller. En los fetos femeninos 46XX, la ausencia de AMH en la semana 7, provoca el desarrollo de los conductos Müllerianos: trompa de Falopio, útero y tercio superior de la vagina.

Es una glicoproteína dimérica compuesta por dos monómeros de 72 kDa unidos por puentes disulfuro que pertenece a la super familia de TGF-β, todas ellas involucradas en los procesos de crecimiento y diferenciación celular.

Interactúa con dos receptores. El receptor tipo II une a la hormona y el tipo I inicia la señal. El receptor tipo II fue clonado y su funcionalidad es diferente de los otros miembros

de la súper familia de TFG-β.

La AMH disminuye con la edad, aunque su expresión inmunohistoquímica en cada folículo no cambia. La disminución de AMH en suero correlaciona con la disminución de folículos en crecimiento y es proporcional al número de folículos primordiales, por lo cual es un excelente marcador de reserva ovárica y representa el "status" de fertilidad reflejando el número de folículos que entran al pool en crecimiento y que no es controlado por las gonadotropinas.

Considerando que la AMH se encuentra involucrada en el reclutamiento folicular inicial y cíclico, es de sumo interés investigar su papel en pacientes anovulatorias, infértiles y/o hiperandrogénicas.

Los valores elevados de AMH obtenidos en esas pacientes actuarían en forma parácrina inhibiendo la ovulación espontánea. Estos altos niveles de AMH ocasionan menor número de ovocitos maduros y menor tasa de fecundación y podrían ser responsables de los trastornos en la foliculogénesis. Los folículos primordiales de las pacientes SOP presentaban menor cantidad de células de la pre-

granulosa que en las normales.

Los niveles de AMH en mujeres normales está en el rango de 1,2 a 2,4 ng/ml; en el SOP, los valores son de 2 y 3 veces más elevada. En estas pacientes, la AMH permanece alta hasta edades tardías. Ha sido propuesto que uno de los elementos a definir en la clasificación del SOP sería la concentración de AMH, cuando es superior a 3,0 ng/ml en suero; esto indica que aproximadamente el 79% de esos pacientes estarían correctamente identificadas con SOP⁴⁰.

Los niveles aumentados de AMH están asociados con un aumento de TT más que a la resistencia a la insulina o a los niveles gonadotróficos⁴¹. Resultados similares han sido comunicados por Fonseca y col.⁴²

Ha sido reportado que en la evaluación con AMH, en pacientes que consultaron por alteraciones de la fertilidad, permitió caracterizar el subgrupo de pacientes con SOP por los valores francamente elevados respecto de su edad. Las pacientes con SOP presentaron valores significativamente mayores de AMH en relación a los de Inhibina-B⁴³. Es necesario tener en cuenta las distintas metodologías disponibles para la medición de AMH, ya que pueden introducir una variable a considerar al definir los límites de corte para adecuar los tratamientos de FIV en función de las distintas metodologías empleadas para su valoración.

2) Antígeno Prostático Específico (PSA)

El PSA es una glicoproteína de 33 kDa serina-proteasa con actividad de quimiotripsina. Por su analogía con las IGFBP pudieran tener un gen ancestral común. En el hombre se produce en la próstata y se secreta en el plasma seminal. En el plasma es muy útil como marcador para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de próstata. Está regulado por andrógenos mediado por su interacción con su receptor.

Con técnicas ultrasensibles recientes, más del 50% de las mujeres tienen niveles detectables de PSA. Con esta metodología ha sido detectado en tejido mamario, ovario y endometrio. Su producción está regulada por andrógenos y en menor magnitud por progestágenos y glucocorticoides. Los estrógenos bloquean la producción inducida por los andrógenos⁴³⁻⁴⁷.

Ha sido comunicado que pacientes con SOP tienen niveles significativamente superiores de PSA respecto a las mujeres normales, y que éste correlaciona positivamente con la TT y con el IAL⁴².

En un estudio previo, nuestro grupo publicó que los niveles de PSA fueron significativamente superiores en mujeres con hirsutismo idiopático que en el grupo control. La fig. 7 muestra los resultados obtenidos en mujeres normales y en pacientes con hirsutismo idiopático⁴⁸. Niveles aumentados de PSA pueden dividirse en dos grupos: 1) que correlacionan positivamente con A2G, y 2) que no correlacionan, indicando que en este tipo de pacientes hirsutas la expresión del PSA podría tener mecanismos de regulación diferentes, sin que hasta el momento esto haya sido dilucidado⁴⁸.

3) Metastatina o Kisspeptina

El gen Kiss-1 codifica una familia de péptidos llamada kisspeptinas. Es un péptido de 54 aminoácido aislado por primera vez de la placenta humana⁴⁹ y demostrado también en otros tejidos, por ejemplo en el sistema nervioso central. El mecanismo de acción se produce mediada por su receptor de membrana identificado como GPR54, activa la fosfolipasa C e incrementa los niveles de calcio; por este mecanismo aumenta la Gn-RH induciendo la liberación de LH y FSH. Este fenómeno podría estar involucrado en el inicio de la pubertad. Por otro lado, en células cancerosas estudiadas de la mama, próstata y melanoma, activa la MAP kinasa, la protein kinasa C, el Inositol 3-fosfato y el fosfo-Akt; disminuye la Colagenasa

IV impidiendo la invasión de células cancerosas. La fig. 8 muestra un esquema del mecanismo de acción de este péptido.

Panidis D y col.⁴⁹ evaluaron los niveles de Kiss-1 en mujeres con SOP; obesas vs de peso normal y correlacionaron los resultados con diversas hormonas y HOMA IR, entre ambos grupos y con un grupo control. Las conclusiones de este trabajo fueron que los niveles de Kiss-1 están asociados negativamente con Índice de Andrógenos Libres IAL solamente en SOP obesas, posiblemente por aumento de RI y disminución de la SHBG.

Chen X y col., en el 7th Annual Meeting (junio 2009) de la Androgen Excess and PCOS Society, presentaron los resultados de LH, FSH, Prolactina, TT, TL, DHEAs, SHBG, Insulina, Glucosa y Metastina obtenidos en 19 adolescentes con SOP; 23 adultas con SOP y 20 adolescentes controles. Los niveles circulantes de Kiss-1 aumentaron en las adolescentes con SOP, respecto a adolescentes controles, y correlacionaron positivamente con LH, TT, TL, y RI. El incremento de Metastina podría estar involucrado en el desarrollo de SOP en las adolescentes.

En un estudio, comparando los niveles de Kiss-1 con andrógenos, gonadotropinas, diversos parámetros de evaluación de lípidos aterogénicos y RI en pacientes con SOP vs un grupo control, se concluyó que Kiss-1 está aumentado aunque no significativo estadísticamente en el SOP respecto a los controles. Sus niveles correlacionaron positivamente con LH y Leptina⁴⁹. En este trabajo no se estudian estas variables en los distintos fenotipos de SOP.

Responsabilidades éticas

Este trabajo fue realizado en los laboratorios particulares de cada autor, con recursos propios.

Conflictos de intereses

Los autores manifiestan no tener conflictos de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndrome. An Endocrine Society clinical practice guideline Elaborada por el task force de la Endocrine Society para lograr consenso de expertos sobre el grado de recomendaciones, valoración, desarrollo y evaluación. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91:1995-2010.
2. Azzis R, Carmina E, Sawaya M: Idiopathic Hirsutism. Endocrine Reviews 2000; 21(4):347-362.
3. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al Criteria for Defining Polycystic Ovary Syndrome as a Predominantly Hyperandrogenic Syndrome: An Androgen Excess Society Guideline, Ann E. Taylor and Selma F. Witchel. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91:4237-4245.
4. Azziz R, Marin C, Hoq L, Badamgarav E, Song P. Health care-related economic burden of the polycystic ovary syndrome during the reproductive life span. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:4650-4658.
5. Diagnostic criteria for Polycystic Ovary Syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JH, Haseltine FP, Mer-

- riam GR, eds. Boston: Blackwell Scientific Publications 1992; 377-384.
6. Chang C, Guvens JH, Haseltine FP, Merriam GR. 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. *Fertil Steril* 2004; 81:19-25.
 7. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kanarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: The complete task force report (Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of the Androgen Excess and PCOS Society). *Fertil Steril* 2009; 91:456-458.
 8. Dunaif A and Fauser BC. Renaming PCOS – a two state solution. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:4325-4328.
 9. Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedarrs MI, Laven J, Norman R, et al. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update* 2014; 20(3):334-352.
 10. Conway CG, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale H, Franks S, Gambineri A, et al. The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. Special interest group European Journal of Endocrinology 2014; 171:1-29.
 11. Goodman NF, Cobin RH, Futterweit W, Glueck JS, Legro RS, Carmina E. American association of clinical endocrinologists, american college of endocrinology, and androgen excess and pcos society disease state clinical review: guide to the best practices in the evaluation and treatment of polycystic ovary syndrome - part 2. *Endocr Pract* 2015; 12 1415-1426. doi: 10.4158/EP 15748.DSCPT2.
 12. Teede H, Misso M, Deeks A, Moran L, Bronwyn GA, Stuckey B, et al. Guideline Development Groups Assessment and management of Polycystic Ovary Syndrome: Summary of an evidence-based guideline *Med J Aust* 2011; 195(6):65. doi: 10.5694/mja11.10915
 13. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger M, Hassan Murad D, et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: An Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:4565-4592.
 14. Woolcock JG, Critchley HO, Munro MG, Broder MS, Fraser IS. Review of the confusion in current and historical terminology and definitions for disturbances of menstrual bleeding. *Fertil Steril* 2008; 90:2269-2280.
 15. Williams T, Mortada R, Porter S. Diagnosis and treatment of Polycystic Ovary Syndrome. *American Family Physician* 2016; 94:106-113.
 16. Fitzgerald R, Herold D. Serum total TT immunoassay compared with negative chemical ionization gas chromatography. *Clin Chem* 1996; 42:749-755.
 17. Dorgan J, Fears T, McMahon R, Aronson F, Patterson B. Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of RIA and mass spectrometry. *Steroids* 2002; 67:151-58.
 18. Taieb J, Mathian B, Millot F, Patriocot M, Mathieu E, Queyrel N, et al. TT measurement by 10 immunoassay and by isotope-dilution gas chromatography- MSMS in sera from 116 men, women and children. *Clin Chem* 2003; 49: 1381-95.
 19. Herold D, Fitzgerald R. Immunoassay for testosterone in women: better than a guess? Editorial. *Clin Chem* 2003; 49:1250-51.
 20. Wang C, Catlin D, Demers L, Atarcevic B, Swerdloff R. Measurement of total TT in adult men: Comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:534-43.
 21. Sikaris K, MaLachlan R, Kaslauskas R. Reproductive hormone reference intervals for healthy fertile young men: evaluation of automated platform assays. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5928-36.
 22. Scaglia HE, Buccini G, Chichizola C, Colombani ME, Corazza N, Corthein C, et al. 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. Presentado a la Androgen Excess and PCOS Society 13th Annual Meeting Siracusa, Sicily, Italy October 4-6, 2015. Poster Presentation: Abstract # 13 y Publicado en RAEM 2015; 52:137-152.
 23. Scaglia HE, Buccini G, Chichizola C, Colombani ME, Corazza N, Corthein C, et al. A Comparison of Serum Total Testosterone (TT) Measurements by Various Methods, Employing Current Validated Techniques, and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). A Multicentric Study. Possible interferences affecting laboratories variability in TT measurements Meeting de la Endocrine Society. Orlando USA abril 2017. Abstract RE 29713 Poster presentation.
 24. Scaglia HE, Aquilano DR, Buccini G, Chichizola C, Corazza N, Corthein C, et al. Quantification of testosterone (Tt) by 8 immunoassays and by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MSMS) in normal and hirsute women. a multicentric study. RAEM 2013; 50:3-18.
 25. 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* 2007; 92:405-413.
 26. Rey Valzacchi G, Kusnetzoff JC, Carrere C, Zylbersztein CC, Aquilano DR, Scaglia HE. Disminución de la testosterona libre y de la fracción no unida a la SHBG en pacientes con disfunción sexual de causa psicológica y alteraciones de la libido. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo* 1998; 35:205-217.
 27. Riesco OF, Aquilano, DR, Scaglia, HE. Descripción de un método simple para la determinación de Testosterona Biodisponible. Evaluación crítica y aplicaciones en la clínica endocrinológica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2002; vol. XXXVI, No 1:5-26.
 28. Pasquali R. Obesity ad androgens: facts and perspectives. *Fertil Steril* 2006; 85:1319-1340.
 29. Veltman-Verhulst SM, van Haften M, Clifton PM, Norman RJ, Wittert GA. Sex hormone binding globulin concentration before conception as a predictor for gestational diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 2010; 25:3123-3128.
 30. Glueck CJ, Morrison JA, Daniels S, Wang P, Stroop D. Sex hormone binding globulin, oligomenorrhea, polycystic ovary syndrome and childhood insulin at age 14 years predict metabolic syndrome and class III obesity at age 24 years. *J Pediatrics* 2011; 156:308-313.
 31. Moran LJ, Teede HJ, Noakes M, Clifton PM, Norman RJ, Wittert GA. Sex hormone binding globulin but not testosterone, is associated with metabolic syndrome in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinological Investigation* 2013; 36:1004-1010.
 32. Lim SS, Norml RJ, Davies MJ, Moran LJ. The effect of obesity on polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Review* 2013; 14:95-109.

33. Hacıhane Fioglu B, Aybey B, Hakan Ozon Y, Berkil H, Karsıdag K. Association of anthropometric, androgenic and insulin-related features with polymorphisms in exon 8 of SHBG gene in women with polycystic ovary syndrome *Gynecol Endocrinol* 2013; 29:361-364.
34. Wickham EP III, Ewens KG, Legro RS, Dunaif A, Nestler JE, Strauss JF III. Polymorphisms in the SHBG gene influence serum SHBG levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:E719-E727.
35. O'Reilly MW, Taylor AE, Crabtree NJ, Hughes BA, Capper F, Crowley RK, Stewart PM, Tomlinson JW, Arlt W. Hyperandrogenemia predicts metabolic phenotype in polycystic ovary syndrome: the utility of serum androstenedione. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:1027-1036.
36. Keefe CC, Goldman MM, Zhang K, Clarke K, Reitz N, Welt CK. Simultaneous Measurement of Thirteen Steroid Hormones in Women with Polycystic Ovary Syndrome and Control Women Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *PLoS One*. Published: April 8, 2014 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093805>
37. Janse F, Eijkemans M, Goverde AJ, Lenties EGWM, Hoek A, Lambalk CB, et al. Assessment of androgen concentration in women: liquid chromatography-tandem mass spectrometry and extraction RIA show comparable results. *European J Endocrinol* 2011; 165:925-933.
38. Handelsman DJ, Teede HJ, Desai R, Normal RJ, Moran LJ. Performance of mass spectrometry steroid profiling for diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 2017; 32:418-422.
39. Jost A. Recherches sur la differentiation sexuelle de l'embryon de lapin *Arch Anat Microsc Morphol Exp*. 1947; 36:271-315.
40. Cassar S, Teede HJ, Moran LJ, Joham AE, Harrison CL, Strauss BJ, et al. Polycystic ovary syndrome and anti-Müllerian hormone: role of insulin resistance, androgens obesity and gonadotrophins. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:E2539-2548.
41. Fonseca HP, Brondi RS, Piovesan FX, Miklos TG, Aldrighi JM. Anti Müllerian hormone and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Biomed Res Int* 2014; 980429; 2014. doi: 10.1155/2014/980429. Epub 2014
42. Sequera AM, Venditti A, Perotti A, Neuspiller N, Zylbersztein C. Inhibina B y Hormona Antimülleriana: nuestra experiencia en Poliquistosis de ovario y otras alteraciones de la fertilidad. *Raem* 2007; vol 44 (supl), resumen 61: pag 127.
43. Rudnicka E, Radowicki S, Suchta K. Prostate specific antigen (PSA) in diagnosis of polycystic ovarian syndrome – a new insight. *Gynecol Endocrinol* 2016; 32:931-935.
44. Riesco O, Storani ME, Blaustein C, Aquilano DR, Scaglia J, Scaglia HE. Niveles circulantes de Antígeno Específico de Próstata (PSA) en mujeres con hirsutismo idiopático (HI). *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo* 2005; 42(4):137-147.
45. Dimitrios N, Melegos, HeYu M, Wang C, Stanczy F, Diamandis E. Prostate-Specific Antigen in Female Serum, a Potential New Marker of Androgen Excess. 1997; 82 (3):777-780. doi:10.1210/jcem.82.3.3792.
46. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979; 17:159-163.
47. Yu H, Berkel H. Prostate-specific antigen (PSA) in women. *J La State Med Soc* 1999; 151:2019-2023.
48. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; 411:613-617.
49. Panidis D, Macut D, Farmakiotis D, Rousso D, Kourtis A, Katsikis I, et al. Indices of Insulin Sensitivity, Beta Cell Function and Serum Proinsulin Levels in the Polycystic Ovary Syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 127 (1):99-105.
50. Ozay OE, Pzay AC, Acar B, Cagliyan E, Seçil M, Kue T. Role of Kisspeptin in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gynecol Endocrinol* 2016; 32:718-722.