

## CONTROVERSIAS EN EL DIAGNOSTICO BIOQUIMICO DE DEFICIT DE HORMONA DE CRECIMIENTO

Dres. E. A. Chaler, M. Maceiras, J. M. Lazzati, M. Mendioroz, M. A. Rivarola\*, A. Belgorosky\*\*

### INTRODUCCION

El crecimiento es una propiedad inherente de la vida. El crecimiento normal somático requiere de la integración de funciones hormonales, metabólicas, y de otros factores involucrados en el eje hipotálamo-hipofisario.

El componente hipotalámico que estimula la liberación de Hormona de Crecimiento (GH), es el sistema Factor Liberador de Hormona de Crecimiento (GHRH). Mientras que el principal factor inhibitorio es el factor inhibidor de GH (GHIF). Existen receptores específicos para cada uno en células de la hipófisis anterior, GHRHR y GHIFR respectivamente.

En respuesta al estímulo de GHRH la adenohipófisis anterior produce GH, la cual es un péptido de una sola cadena de 191 aminoácidos codificada por el gen de GH-1; y que es regulado positivamente por neurotransmisores serotoninérgicos, dopaminérgicos, \_ adrenérgicos, la L-Dopa y el sueño; y negativamente por receptores \_ adrenérgicos<sup>1</sup>.

La producción de GH es controlada casi exclusivamente por el sistema nervioso central, se produce en forma pulsátil de forma que, más de la mitad de la cantidad total liberada diariamente, pasa a la sangre durante el sueño; es liberada a la circulación donde es transportada por una proteína de unión específica, denominada Proteína Transportadora de GH (GHBP).

El diagnóstico de la deficiencia de GH (GHD) en la infancia es un proceso multifactorial que requiere una evaluación clínica y auxológica, com-

binada con pruebas bioquímicas del eje GH-IGF-I y evaluación radiológica<sup>2</sup>.

La evaluación bioquímica más difundida del eje GH-IGF-1 es por un lado la determinación de la concentración de la GH sérica basal y la respuesta de la GH a estímulos farmacológicos. Por otro lado la evaluación del mediador biológico de la GH sobre el crecimiento lineal, el sistema de IGFs, siendo el IGF-I el más utilizado<sup>3</sup>.

En el sistema de IGFs participan los IGFs (IGF-I, IGF-II), y las proteínas de unión específicas, denominadas proteínas que unen específicamente IGFs (IGFBPs). Existen 6 IGFBPs pero las que están reguladas por GH son la IGFBP-3 y IGFBP-5. Los IGFs circulan en complejos binarios unidos específicamente a las IGFBPs pero alrededor del 80% circulan en forma de complejos ternarios con la IGFBP-3 y una proteína que también tiene su síntesis regulada por GH, la Proteína Acido Lábil (ALS).

Analizando los componentes del sistema, y en acuerdo con lo publicado en la literatura internacional en el servicio de Endocrinología del Hospital de Pediatría Garrahan hemos propuesto la siguiente estrategia para definir el déficit de GH (DGH) combinando aspectos bioquímicos y parámetros auxológicos.

Evaluación de:

- 1) Respuesta de los niveles de GH sérica a tests de estímulos farmacológicos.
- 2) Los niveles séricos de IGF-I y de IGFBP-3<sup>3</sup>.
- 3) Correlación de los criterios bioquímicos de diagnóstico con parámetros auxológicos durante el primer año de tratamiento con Hormona de Crecimiento recombinante humana.

Sin embargo a pesar que esta estrategia no parece generar controversias, la experiencia ha demostrado que realizar diagnóstico de DGH fre-

Servicio de Endocrinología.

\* Investigador Superior CONICET, \*\* Investigadora Principal CONICET.

Jefa del Servicio de Endocrinología.

Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan.

cuentemente resulta ser controvertido si no se realiza con la rigurosidad y conocimiento de su problemática.

### 1) Respuesta de los niveles de GH sérica a tests de estímulos farmacológicos (TF).

#### **Definición del límite de Corte diagnóstico**

Diversos estudios han confirmado que la secreción de GH es pulsátil por lo cual los niveles séricos basales no son totalmente informativos para evaluar una alteración de su secreción. Los TF de estímulo de la secreción de GH representan una herramienta valiosa para evaluar una alteración en la secreción de GH.

Dado que la producción de GH es dependiente de hormonas tiroideas y glucocorticoides, en el caso de deficiencias concomitantes, estas deben ser adecuadamente sustituidas previo al estudio del eje GH-IGFs.

El criterio universalmente aceptado para descartar el diagnóstico de DGH es que se obtenga un valor igual o por encima del corte diagnóstico en uno de los dos test de estímulo farmacológicos realizados.

El trabajo de Marín y col<sup>4</sup> aporta información sobre la variabilidad de respuesta de GH en niños normales y una evidente dependencia de los niveles estimulados máximos de GH en relación al desarrollo puberal. También han demostrado que el pre-tratamiento con etinil-estradiol (40 µg/m<sup>2</sup> por dos días) permitió incrementar la respuesta máxima de GH a los TF. Por otro lado el estudio realizado por Martínez y col<sup>4</sup> muestra que el pre-tratamiento con estradiol micronizado a una dosis de 1-2 mg/día, incrementa la sensibilidad y especificidad diagnóstica de GHD de los TF bajo estímulo con Arginina y Clonidina. Resultados similares fueron obtenidos con el pretratamiento con estradiol transdérmico<sup>5</sup>.

Aunque no existe un acuerdo generalizado sobre la necesidad del pre-tratamiento con esteroides sexuales, la Comisión Nacional Asesora para el tratamiento con Hormona de Crecimiento del Ministerio de Salud Pública de la Nación, por resolución 120 del año 1992, recomienda el pre-tratamiento con esteroides sexuales (estrógenos o testosterona inyectable 100 mg por vía intramuscular 7 días antes de la prueba) cuando el paciente presenta una maduración esquelética igual o mayor a 8 años evaluada con el método de Greulich y Pyle.

Definir cuál es el punto de corte diagnóstico para el diagnóstico de DGH, generó y aun genera controversias, ya que los diferentes inmunoensayos arrojan resultados muy diferentes y no existe un acuerdo de armonización de los mismos.

Las posibles causas de resultados discrepantes entre los diferentes inmunoensayos podrían ser secundarias a<sup>6,7</sup>:

- 1) Diferentes estándares de referencia utilizados en los ensayos de GH<sup>8</sup>.
- 2) Heterogeneidad de las formas circulantes de GH, Formas monoméricas y oligoméricas y complejos con proteínas transportadoras.
- 3) Interferencia de la GHBP endógena. (fue superada en los ensayos de última generación).
- 4) Diferentes epitopes reconocidos por los diferentes anticuerpos. (posiblemente la mayor fuente de discrepancia entre ensayos).
- 5) Matriz en que están preparados los calibradores, ya que no todos están preparados en suero lo que pueden generar diferencias con los resultados obtenidos en los pacientes.

Los TF están descriptos desde los años 60'; la hipoglucemia insulínica, descripto por Roth & col (1963)<sup>9</sup>, Arginina (Marrimee & col, 1965<sup>10</sup> y Parker & col en 1967<sup>11</sup>), Ejercicio (Keenan & col<sup>12</sup>, y Buckley & col<sup>13</sup> en 1972), L-Dopa (Weldon & col en 1973<sup>14</sup>), y Clonidina (Gil-Ad & col en 1979<sup>15</sup>). En estos estudios iniciales los niveles de GH sérica eran evaluados mediante radioinmunoensayo, en presencia de anticuerpos policlonales. Con esta metodología se definió un límite de corte diagnóstico para evaluar la respuesta de la GH sérica luego de los TF de 10 ng/ml.

A partir de los años 80' y 90' la generalización de los ensayos de GH, la utilización de anticuerpos monoclonales, el cambio de estándar de referencia y la aparición de métodos automatizados, hizo que la discrepancia fuera un problema a tener en cuenta para la interpretación de resultados<sup>16</sup>.

El cambio metodológico de los equipos de diagnóstico comerciales para la medición de los niveles séricos de GH generó controversias sobre cuál era el límite de corte diagnóstico, lo que aún provoca comentarios en la literatura internacional, sugiriendo que el límite de corte de 10 ng/ml inicialmente definido debe ser reanalizado en función de las metodologías<sup>17</sup>. Por lo tanto definir correctamente el límite de corte diagnóstico impacta fuertemente en las decisiones terapéuticas.

En nuestro medio los TF utilizados son la infusión de Arginina (0.5 g/kg de peso durante 30 minutos, dosis máxima de 30g) y Clonidina (100 µg/m<sup>2</sup>). Este último solo puede ser utilizado en niños mayores de 12 meses de edad cronológica.

Con el objetivo de precisar el diagnóstico de DGH en el Servicio de Endocrinología del Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, en el año 2001<sup>19</sup> se realizó una comparación bioquímica, para lo cual a partir de un grupo de sueros que cubrían todo el rango de medida, se evaluó la GH sérica por distintos métodos y en algunos casos el mismo método, con diferente estándar de referencia.

El método SER 66/217 Maia Clone para evaluar GH sérica, tiene condiciones de desempeño

similares a los ensayos que se utilizaban en los trabajos originales, utiliza como estándar de referencia el 66/217, y como anticuerpos, un set de monoclonales que identifican todas las formas circulantes de GH (GHtotal); este comportamiento fue comprobado en la práctica.

Con los resultados obtenidos para todos los métodos de evaluación de la GH sérica, se realizó una regresión lineal y se calculó cuál era el valor para cada método, cuando por el ensayo SER 66/217 el resultado era de 10ng/ml. Los valores obtenidos variaron según la especificidad de la forma molecular evaluada y el estándar de referencia utilizado en cada ensayo (Tabla 1).

Un estudio estadístico (Bland y Altman modificado) demostró que estas relaciones se mantienen a lo largo de todas las concentraciones mensurables.

Por lo tanto podemos afirmar que para métodos que miden todas las formas de GH circulante el punto de corte es 10 ng/ml, como estaba publicado, para métodos que evalúan la forma 22kDa. Para otras formas el corte está entre 6 y 7 ng/ml y para métodos que evalúan solo la forma 22K el corte esta entre 4 y 5 ng/ml, finalmente para el método que mide la forma 22K y usa el estándar de referencia 88/624 el corte diagnóstico es 3 ng/ml. (ver Tabla 1<sup>18</sup>).

## 2) IGF-I e IGFBP-3 como parámetros bioquímicos de DGH

El dosaje de IGF-1 e IGFBP-3 es utilizado para la valoración del eje GH-IGFs-IGFBPs, en DGH, como así también para monitorear el tratamiento con rhGH (21). Se han descrito discrepancias en

el dosaje del IGF-I sérico en los valores obtenidos con diferentes inmunoensayos<sup>22,23</sup>. Los valores normales obtenidos en nuestro servicio muestran un incremento de los valores de IGF-I e IGFBP3 durante los primeros años de vida, como fue descrito, y reflejan la presencia de un dimorfismo sexual en los valores de IGF-1 sérica en la prepubertad tardía y la pubertad temprana (Figura 1).

Juul y col no encuentran diferencias significativas de IGF-I sérica entre varones y mujeres, pero utiliza un radioinmunoensayo con extracción alcohol-ácido<sup>24</sup>; Sin embargo la presencia de dimorfismo sexual es un tema controvertido sobre todo durante el período peripuberal<sup>125-26</sup>. Si se tiene en cuenta que los niveles séricos de estradiol son mayores en niñas que en niños durante la prepubertad<sup>27</sup>, se podría especular que el diferente medio estrogénico, podría condicionar el dimorfismo sexual observado. Además es importante remarcar que en niños menores a 4 años de edad cronológica, la capacidad de discriminación diagnóstica de DGH de los niveles séricos de IGF-I es claramente menos informativa<sup>27</sup>.

Por otro lado se ha descrito que la evaluación de los niveles séricos de IGFBP3, si bien presenta una alta especificidad para el diagnóstico de DGH, la sensibilidad es menor si se la compara con la del IGF-1<sup>28</sup>.

## 3) Correlación de los criterios bioquímicos de diagnóstico con parámetros auxológicos durante el primer año de tratamiento con Hormona de Crecimiento recombinante humana

Con el objeto de validar el límite de corte diagnóstico de la respuesta de la GH sérica a los TF,

**TABLA 1: ENSAYOS SERICOS DE GH COMPARADOS EN ESTE ESTUDIO: CARACTERISTICAS DE LOS ENSAYOS.**

ensayo	Isotópico/ no isotópico	Anticuerpos	Estándar de referencia (WHO IRP)	Específico para 22kDa	aCV%i	CV%e	Valor de y para x=10ng/ml en SER 66/217
SER 66/217	I	M/M	IRP 66/217	cNo	5.0	7.0	
SER 80/505	I	M/M	IRP 80/505	No	8.3	11.7	10.11
SER 88/624	I	M/M	IRP 88/624	No	4.2	5.9	4.39
IMM 80/505	I	M/M	IRP 80/505	Si	6.6	9.3	5.04
DELFLIA 80/505	N	M/M	IRP 80/505	Si	3.3	4.7	4.81
DSL 80/505	I	M/M	IRP 80/505	Si	7.8	11	4.16
DPC Q 80/505	N	M/M	IRP 80/505	No	6.0	8.5	6.11
NI 80/505	I	M/M	IRP 80/505	No	5.4	7.7	6.53
DPC RIA 66/217	I	P	IRP 66/217	No	13	18	7.21
DSL 88/624	I	M/M	IRP 88/624	Si	7.8	11	2.95

a. CVi y Cve, Coeficiente de variación intra y entre ensayos, respectivamente.

b. I: isotópico; N: no isotópico; M: anticuerpo monoclonal; P: anticuerpo policlonal.

c. "No" indica no específico o que la información no fue disponible.

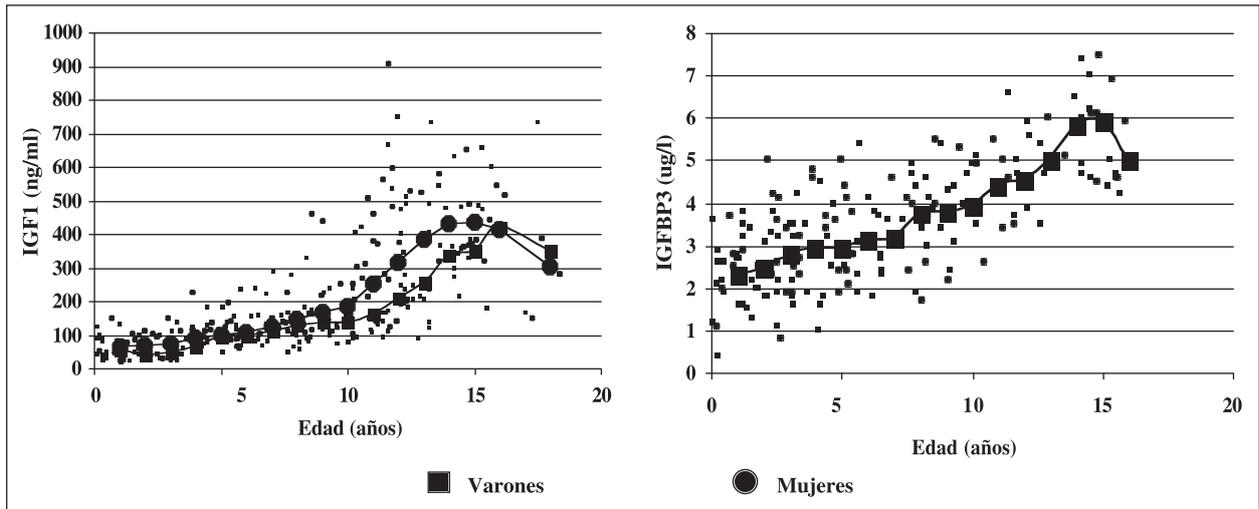


Figura 1: Rango de referencia de IGF-I e IGFBP-3 séricas.

en el año 2006 se evaluó con qué sensibilidad y especificidad los límites de corte diagnóstico establecidos con 2 métodos diferentes para la medición de GH, eran capaces de diferenciar pacientes con y sin DGH<sup>29</sup>.

Dado que en el estudio de Ranke et col<sup>19</sup> se observó una correlación inversa entre la velocidad de crecimiento (VC) durante el primer año de tratamiento con rhGH y el pico máximo (pMax) de la GH sérica en respuesta al TF, en nuestro estudio se utilizó la VC durante el primer año de tratamiento como parámetro de respuesta clínica. Los pacientes con DGH incluidos en el estudio presentaban los siguientes parámetros auxológicos: talla (SDS) <-2.0 y VC (SDS) <-1.3 y bioquímico niveles séricos de IGF-1(SDS) <-1.67, de

acuerdo a lo previamente definido por Boquete y col<sup>3</sup>.

Se seleccionó un grupo de pacientes bajo tratamiento con GH, con TF en un amplio rango de respuestas, los pMax de la GH sérica obtenidos fueron medidos por dos métodos, uno que mide GHtotal y otro que evalúa específicamente la isoforma molecular biológicamente mas activa (22kDa).

En primer lugar se halló al igual que lo observado en el estudio de Ranke y col (19) una correlación negativa y significativa entre el pMax de GH y la VC durante el primer año con los dos métodos de medición. (Figura 2<sup>20</sup>).

Se construyó una curva ROC y se encontró que una VC de +1.91 SDS durante el primer año

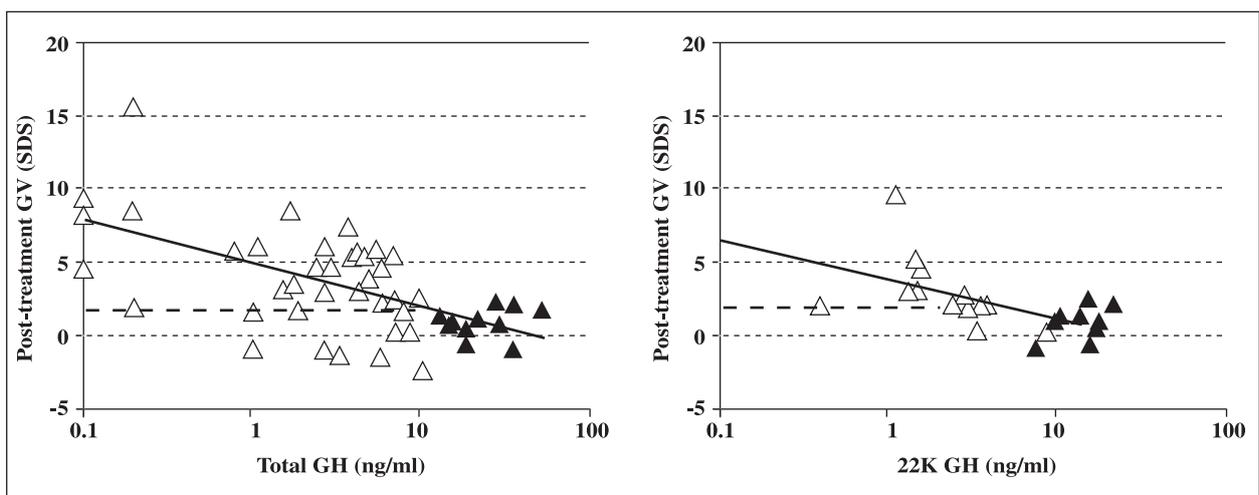
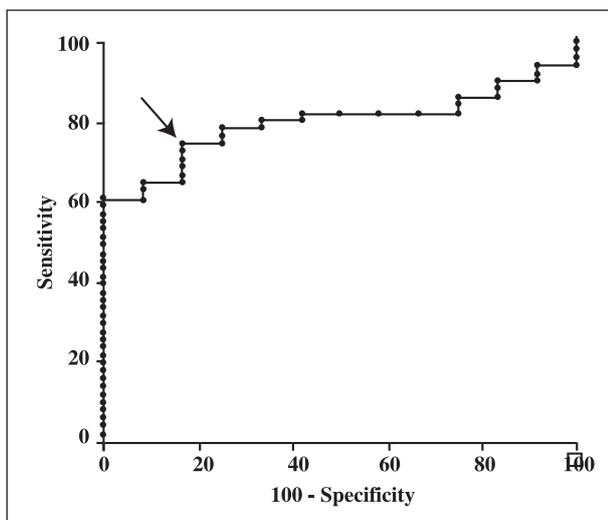


Figura 2: La correlación entre el VC SDS durante el primer año de tratamiento con rhGH y el pMax de GH de respuesta a test farmacológicos, para ambos Ghtotal (panel izquierdo) y GH 22kDa (panel derecho). Una correlación negativa fue encontrada. El mejor punto de corte diagnóstico VC SDS previamente definido (1.91 SDFS) fue usado para leer el correspondiente valor en suero de GH, sobre ambas curvas de regresión. Triángulos abiertos: pacientes GHD; triángulos cerrados: pacientes sin déficit.

de tratamiento es el mejor indicador en cuanto a sensibilidad y especificidad, para diferenciar los pacientes con DGH, de aquellos que no lo tienen (Figura 3<sup>20</sup>). Además se pudo establecer que los límites de cortes diagnóstico para GHtotal de 10,32 ng/ml y para GH22kDa de 5,38 ng/ml en función de la VC en el primer año de tratamiento, podrían discriminar con una sensibilidad del 74% y una especificidad del 84% los pacientes con y sin DGH. Estos resultados avalan los límites de corte diagnóstico de la respuesta de la GH sérica a los TF definidos en el laboratorio de diagnóstico clínico del servicio de Endocrinología del Hospital de Pediatría Garrahan.



**Figura 3:** Curva ROC estable el mejor umbral VC-SDS, que durante el primer año de tratamiento con rhGH diferencia pacientes con GHD de aquellos sin déficit. Una VC SDS de 1.91 fue definida como el mejor umbral con una sensibilidad del 74% y una especificidad del 84% (flecha).

### CONCLUSIONES

Los indicadores principales del déficit de crecimiento son parámetros auxológicos; una talla o velocidad de crecimiento por debajo de la media de la población, pueden ser detectados por el núcleo familiar o el entorno social. La evaluación por el especialista definirá la estrategia para evaluar la etiología entre las cuales podrá incluirse la evaluación del eje GH-IGFs.

El diagnóstico bioquímico del DGH se basa en respuestas a test de estímulos farmacológicos de la GH sérica. Los primeros reportes propusieron que una elevación a más de 10 ng/ml como aceptable, pero otros valores también han sido usados. Sin embargo el reemplazo de ensayos bioquímicos que utilizan anticuerpos policlonales que evalúan todas las formas de GH circulante (GHtotal), por ensayos que utilizan anticuerpos monoclonales que sólo miden la forma de 22kDa, generó grandes discrepancias en los resultados obtenidos.

Es importante tener en cuenta que el límite de corte diagnóstico de la respuesta de GH sérica en tests farmacológicos, varía según el inmunoen ensayo utilizado.

Es importante remarcar que todo límite de corte es por definición arbitrario y necesariamente intenta balancear la sensibilidad y la especificidad. Además la DGH parecería ser un espectro continuo desde alteraciones mínimas hasta deficiencias totales.

Otra evaluación bioquímica que se ha descrito como capaz de diagnosticar DGH, es la medida del IGF-1 sérico; esta medida debe ser realizada utilizando rangos de referencia para el método utilizado por edad, sexo, desarrollo puberal de la población en estudio. Los niveles de IGF1 e IGFBP3 séricos deben informarse además de en sus valores absolutos, en unidades de desvío estándar, ya que varían con la edad a lo largo de la niñez y la pubertad. Se debe tener en cuenta que en los niños que presenten alteraciones cronológicas de la pubertad (adelanto o atraso) la expresión de IGF1 e IGFBP3 debería referirse al desarrollo puberal del paciente.

Finalmente el pediatra debe estar alertado que el diagnóstico de DGH es un tema controvertido y que si bien existen equipos comerciales que facilitan la determinación de los niveles séricos de GH, IGF-1 y IGFBP-3, la interpretación de los resultados debe ser realizada por profesionales bioquímicos con amplia experiencia en el tema.

### REFERENCIAS

1. Genetic control of growth. P. Mullis. *European Journal of Endocrinology*. 2005; 152:11-31.
2. GH Research Society. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: Summary statement of the GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3990-3993.
3. Boquete HR, Sobrado PG, Fideleff HL, Sequeira AM, Giaccio AV, Suarez MG, Rubial G, Miras M: Evaluation of diagnostic accuracy of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 in growth hormone-deficient children and adults using ROC plot analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4702-4708.
4. Marin G, Domene HM, Barnes KM, Blackwell BJ, Cassorla FG, Cutler Jr. GB. The effect of estrogen priming and puberty on growth hormone response to standardized treadmill exercise and arginine-insulin in normal girls and boys. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 79:537-541.
5. Martínez AS, Domene HM, Ropelato MG, Jasper HG, Pennisi Pa, Escobar ME, Heinrich JJ. Estrogen priming effect on growth hormone (GH) provocative test: A useful tool for the diagnosis of GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:4168-4172.
6. Borghi MMS, Longi CA, Calliari LE, Faria CDC, Kochi C, Monte O. Transdermal estradiol priming during clonidine stimulation test in non-growth hormone deficiency children with short stature: A pilot study. *J Ped Endocrinol Metab*. 2006; 19:223-227.
7. Baumann G. Growth hormone heterogeneity in human pituitary and plasma. *Hormone research*. 1999; 51(1):2-6.
8. Baumann G: Growth hormone heterogeneity: genes, iso-hormones, variants, and binding proteins. *Endocr Rev* 1991;12: 424-449.
9. Bristow AF. International standards for growth hormone. *Horm Res* 1999; 51(Suppl 1):7-12.
10. Roth J, Glick SM, Yalow RS, Berson SA, Hypoglycemia: a potent stimulus to secretion of growth hormone. *Science* 1963; 31(140):987-8.