

Puesta al día: pruebas de laboratorio en Endocrinología y Nutrición

BIOCHEMICAL DIAGNOSIS OF GROWTH HORMONE DEFICIENCY

Biochemical diagnosis of growth hormone (GH) deficiency is controversial. Despite advances in assay design, many factors inherent to the physiology of GH secretion and the lack of consensus on methodological issues hamper resolution of these controversies. The results obtained with various assays show wide variability due to differences in the antibodies used and the distinct reference preparations employed for the calibration of assay kits.

Despite its limitations, provocation testing continues to be performed. However, there is no definitive clinical or biochemical test for the diagnosis of GH deficiency. Endocrinologist should be familiar with the specificity and limitations of biochemical tests. Biochemical data should be interpreted in the clinical context and should not be the only criterion used to establish the diagnosis.

Key words: Growth hormone. Immunoassay. Stimulation tests.

Diagnóstico bioquímico de la deficiencia de hormona de crecimiento

MONTSERRAT MAURI Y ROCÍO ALFAYATE

Laboratorio de Hormonas. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital General Universitario de Alicante. Alicante. España.

El diagnóstico bioquímico de la deficiencia de hormona de crecimiento (GH) es un tema controvertido. Los avances tecnológicos no han contribuido a su esclarecimiento debido a muchos factores inherentes a la fisiología de la secreción de GH y a la falta de consenso en muchos aspectos metodológicos. Los resultados obtenidos con los distintos inmunoanálisis presentan una gran variabilidad por los distintos anticuerpos utilizados y los diferentes calibradores.

A pesar de sus limitaciones, se sigue utilizando pruebas farmacológicas de estímulo. Sin embargo, no existe en la actualidad ninguna prueba bioquímica ni clínica definitiva para el diagnóstico del déficit de GH. El endocrinólogo debe conocer la especificidad y las limitaciones de los métodos de laboratorio. Los datos bioquímicos deben interpretarse en el contexto clínico y no deben ser utilizados como único criterio para establecer un diagnóstico.

Palabras clave: Hormona de crecimiento. Inmunoanálisis. Pruebas de estímulo.

INTRODUCCIÓN

Con el paso de los años el diagnóstico bioquímico de la deficiencia de hormona de crecimiento (GH) sigue siendo un tema controvertido¹. Los avances tecnológicos no han contribuido a su esclarecimiento debido a muchos factores inherentes a la fisiología de la secreción de GH y a la falta de consenso en muchos aspectos metodológicos. La heterogeneidad de la molécula de GH se traduce en distinta reactividad según el inmunoanálisis utilizado para su medida y, como consecuencia, en una variabilidad en los resultados obtenidos²⁻⁶.

Consideraremos los aspectos más relevantes desde el punto de vista del laboratorio.

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO

En los últimos 25 años ha habido muchos cambios en los métodos de determinación de la concentración de GH en suero. Los radioinmunoanálisis iniciales, con anticuerpos policlonales, se si-

Correspondencia: Dra. M. Mauri.
Laboratorio de Hormonas. Hospital General Universitario de Alicante.
Pintor Baeza, 12. 03010 Alicante. España.
Correo electrónico: mauri_mon@gva.es

Manuscrito recibido el 15-1-2007 y aceptado para su publicación el 30-1-2007.

TABLA 1. Características de los inmunoanálisis comercializados más utilizados en los laboratorios clínicos

Fabricante	Detección	Anticuerpos	FC	SI	GH 20 kDa
DPC Immulite	CLM	MC/PC	2,6	80/505	63%
Nichols Advantage*	LM	MC/PC	2,5	80/505	47%
Perkin Elmer Delfia	FL	MC/MC	2,6	80/505	< 0,01%
Beckman Access	LM	MC/PC	2,6	80/505	< 3,7%
Brahms IRMA	125-I	MC/MC	2	80/505	?
Cis BioHGH	125-I	MC/MC	1,2	98/574	5%
Dia Sorin-IRMA	125-I	MC/MC	2	80/505	100%
Tosoh-Bioscience	FL	MC/MC	2,6	80/505	< 5%
Immuno-tech IRMA	125-I	MC/MC	2	80/505	< 5%

125-I: isotopic assay; CLM: chemoluminescent immunometric assay; FC: factor de conversión a unidades internacionales; FL: fluoroimmunoassay; LM: luminometric assay; MC: monoclonal antibody; PC: polyclonal antibody; SI: estándar internacional.

*Nichols ha interrumpido recientemente el suministro de reactivos.

guieron de métodos inmunoradiométricos con anticuerpos monoclonales. Más recientemente, éstos han sido sustituidos por inmunoanálisis no isotópicos, automatizados, que los han hecho asequibles al laboratorio general.

Si bien ha habido importantes avances en la sensibilidad, la precisión y el tiempo de respuesta del laboratorio, se utiliza gran variedad de anticuerpos que no reconocen de igual manera las distintas formas moleculares de GH. Además, falta consenso en los calibradores empleados y, en consecuencia, cierta confusión en las unidades de medida⁷.

Anticuerpos

La molécula de GH presenta una gran heterogeneidad: formas monoméricas de 22 kDa y 20 kDa, formas diméricas, trímeros, oligómeros y distintos fragmentos. Su concentración en sangre circulante varía intraindividual e interindividualmente, en función de los picos secretorios y la distinta velocidad de aclaramiento.

Los anticuerpos utilizados por los distintos inmunoanálisis presentan diferente especificidad para cada una de las formas moleculares y, como consecuencia, los valores obtenidos con los distintos métodos presentan una gran variabilidad.

En la tabla 1 se relacionan los inmunoanálisis más empleados en la actualidad y el tipo de anticuerpo utilizado⁸.

Por otro lado, la GH circula parcialmente unida a una proteína específica de alta afinidad, la GHBP, que representa la porción extracelular del receptor de GH y a la vez ejerce un efecto modulador de la vida media de la hormona. El contenido de GHBP en la matriz de los calibradores, de los que se trata a continuación, puede influir en los resultados de GH obtenidos⁹.

Estandarización

Los calibradores utilizados en los equipos comerciales de reactivos, *kits*, vienen valorados frente estándares internacionales cuya potencia biológica o bioactividad ha sido establecida previamente por comités de expertos.

Los primeros estándares utilizados (66/217 y 80/505) procedían de extractos hipofisarios humanos. Debido a su disponibilidad limitada y a la diferente proporción de formas moleculares según el lote de procedencia, fueron sustituidos en 1994 por un estándar obtenido por tecnología de ADN recombinante (88/624). En el 2001 se aprobó un segundo estándar recombinante (98/574), similar al anterior, pero en el que se mejoró el control de impurezas. Estos estándares contienen hGH de 22 kDa, de un 95% de pureza, y su actividad específica se estableció en 3 U/mg¹⁰.

La coexistencia de varios de estos estándares tiene como consecuencia que los *kits* circulantes en el mercado no están calibrados frente a un único estándar. A pesar de que se recomienda el uso de la preparación de referencia 88/624, obtenida por ADN recombinante, la mayoría de los inmunoanálisis comercializados estaban calibrados, hasta muy recientemente, frente al estándar de origen hipofisario 80/505⁹.

Unidades

Se intentó consensuar el uso del estándar internacional 98/574, cuya actividad específica se estableció en 3 U/mg, para calibrar todos los *kits* comerciales. Los resultados de las concentraciones de GH podrían expresarse en unidades de masa, molares o de bioactividad. Sin embargo, las unidades molares no son apropiadas, dada la heterogeneidad molecular de la GH. Las unidades de bioactividad tendrían la ventaja de mantener la continuidad con datos previos, pero hay que tener en cuenta que la estructura y la pureza de la preparación de referencia se definió en términos físico-químicos. Por todo ello, se acordó que la unidades de masa eran más apropiadas.

En el proceso de cambio de estandarización, todavía no concluido, muchos fabricantes observaron que los resultados obtenidos al calibrar con la preparación 98/574 variaban alrededor del 20%, lo cual creaba mucha confusión entre los usuarios. Como consecuencia, algunos de ellos establecieron un factor de conversión propio. Por ejemplo, Diagnostics Products Corporation (DPC), distribuidora de los reactivos para el analizador Immulite 2000, estableció de forma experimental el factor de conversión 2,4.

Control de calidad

Un dato significativo es que los programas de control de calidad externo más utilizados en España, promovidos por sociedades científicas, no incluyen la GH. Los laboratorios deben emplear controles comerciales o adherirse a programas internacionales.

Como prueba de todo lo expuesto, citaremos que el coeficiente de variación entre los distintos inmunoanálisis ($n = 20$) para los que está valorado uno de los controles comerciales más utilizados en los laboratorios clínicos (Lyphochek Immunoassay Plus Control, Bio-Rad Laboratories, Irvine, Estados Unidos) está alrededor del 25%, para una media de GH de 9,6 ng/ml, próxima al punto de corte más utilizado (fig. 1).

Por todo ello los resultados obtenidos en distintos laboratorios no son intercambiables.

Condiciones preanalíticas

La concentración de GH en suero o plasma está influida por numerosas variables fisiológicas. Asimismo, la obtención de las muestras debe cumplir unos requisitos apropiados.

- La secreción de GH es pulsátil. La frecuencia y la amplitud de los picos son variables y siguen un cierto ritmo circadiano, con una mayor secreción en la fase del sueño profundo¹¹. Por lo tanto, una determinación aislada tiene un valor muy limitado para el diagnóstico de la deficiencia de GH.

- Edad. La secreción de GH es máxima en la pubertad, para ir disminuyendo paulatinamente en la edad adulta.

- Estrés. Las situaciones de estrés aumentan la secreción de GH. En niños de corta edad, la ansiedad que acompaña a la extracción de sangre puede causar un aumento de secreción que inhiba la posterior respuesta a estímulos farmacológicos, pero que por sí mismo constituye un índice de una reserva adecuada.

- Obesidad. La secreción de GH se correlaciona inversamente con el índice de masa corporal (IMC). En general los niños obesos presentan menor tasa de respuesta a estímulos farmacológicos.

- Obtención de muestras. La extracción de sangre para la determinación de GH se debe realizar con el paciente en ayunas. Aunque en la mayoría de los laboratorios se utiliza suero para el análisis, el plasma obtenido con EDTA o heparina es igualmente apropiado. Las muestras deben congelarse a -20°C si no se procesan el mismo día o a -80°C para tiempos prolongados. La lipidemia intensa, la bilirrubinemia y la hemólisis pueden causar interferencias.

GH en orina

La concentración de GH en orina es muy inferior a la concentración en suero. Los kits normalmente utilizados para su determinación en plasma no tienen suficiente sensibilidad para detectar la GH urinaria. Ini-

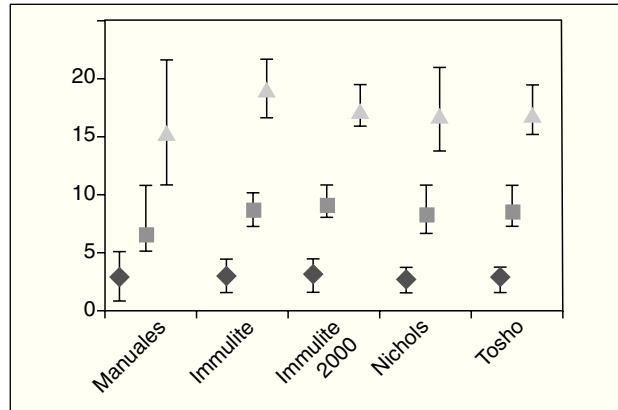


Fig 1. Resultados obtenidos en los distintos niveles del (▲, alto, ■ medio y ◆ bajo) control comercial Lyphochek Immunoassay Plus Control (BIO-RAD), en los diferentes métodos.

cialmente se introdujeron en ellos modificaciones para aumentar la sensibilidad. Posteriormente aparecieron métodos comercializados. En cualquier caso, en la actualidad ha decrecido el interés por la GH urinaria, como se comenta más adelante.

EXPLORACIÓN FUNCIONAL EN LA INFANCIA

Debido al patrón de secreción pulsátil, una determinación aislada de GH carece de valor en la sospecha de la deficiencia de GH (DGH). Existe consenso en que son necesarias dos pruebas de estímulo para el diagnóstico.

Pruebas de estímulo

Si bien se han utilizado algunas pruebas fisiológicas (sueño y ejercicio), las pruebas más frecuentemente usadas en la actualidad son farmacológicas. Existen más de 30 descritas³, aunque las más practicadas son la hipoglucemia insulínica, la prueba de clonidina, la de arginina y la de glucagón. La hipoglucemia insulínica es el estándar, si bien se ha de considerar el riesgo de hipoglucemia grave¹². Un estudio reciente investiga el efecto de la administración oral de glucosa durante la prueba, para ayudar a la recuperación de la hipoglucemia, en la respuesta de GH y cortisol, y concluye que ésta es menor¹³. Sin embargo, cuando las pruebas son realizadas por personal con experiencia y con supervisión médica, los riesgos se minimizan. Se recomienda utilizar, en cada centro, las mismas pruebas a lo largo del tiempo, puesto que facilita su interpretación¹⁴.

Sus principales limitaciones son:

- Puntos de corte arbitrarios, para definir una “respuesta normal”. La concentración que establece la DGH ha variado en los últimos 40 años de 5 ng/ml en 1968 a 7 ng/ml en 1974 y a 10 ng/ml en 1995. Estos cambios han estado relacionados con la disponibilidad

de GH, más que con los cambios en los métodos de medida de su concentración. Actualmente el punto de corte aceptado es 10 ng/ml¹⁵.

- Variabilidad de la respuesta según el estímulo utilizado, la edad, el sexo, el estadio puberal, la obesidad, la hora del día y el entorno psicosocial.

- Hay pocos datos sobre la respuesta a estas pruebas en niños con velocidad de crecimiento normal.

- En edades peripuberales se ha demostrado que la administración previa de estradiol en niñas y testosterona en niños mejora la respuesta a las pruebas de estímulo. Sin embargo, no hay consenso sobre su uso¹⁶.

- Se ha observado una baja reproducibilidad en la respuesta de GH, tanto a pruebas farmacológicas como fisiológicas¹⁷.

- Variabilidad según el método utilizado para medir la concentración de GH, como se ha comentado. Los actuales inmunoanálisis pueden dar concentraciones de GH 2-3 veces inferiores que los antiguos radioinmunoanálisis, mientras que los valores de corte no han sufrido una variación paralela^{2,18-20}.

Por último, se cuestiona la utilidad de las pruebas de estímulo en el diagnóstico de la DGH en niños con talla baja. En su mayoría son molestas para el paciente, no están exentas de riesgos y poseen serias limitaciones como hemos comentado. En algunos países, como Australia, se ha abandonado estas pruebas y los criterios auxológicos son los que deciden qué pacientes requieren tratamiento³.

Secreción espontánea

Aunque es el único método que proporciona información sobre la verdadera secreción fisiológica de la hormona, muy utilizado en la década de los ochenta, cuando estaba vigente el concepto de “disfunción neurosecretora” como indicación de tratamiento²¹, los problemas relacionados con su elevado coste económico, que requiera ingreso hospitalario y múltiples determinaciones, las dificultades para establecer un dintel de normalidad y su limitada reproducibilidad han hecho que su uso, en la actualidad, esté reservado a casos muy especiales.

Hormona de crecimiento en orina

La buena correlación entre la concentración integrada de GH, obtenida en el estudio de secreción espontánea, y la excreción de GH en orina despertó interés varios años. Sin embargo, el solapamiento de valores obtenidos entre niños con talla baja y niños normales y su pobre reproducibilidad hicieron que también se abandonara su uso en la clínica asistencial.

EXPLORACIÓN FUNCIONAL EN EL ADULTO

El tratamiento con GH está indicado únicamente en pacientes con déficit. La guía de consenso de la

Growth Hormone Society y, más recientemente, la de la Endocrine Society establecen los criterios diagnósticos y las pruebas de estímulo apropiadas^{22,23}.

En adultos con deficiencia de GH de comienzo en la infancia, el diagnóstico debe confirmarse. En pacientes con sospecha de deficiencia de GH de comienzo en la edad adulta, basada en antecedentes de enfermedad hipotálamo-hipofisaria, cirugía o irradiación, se ha señalado que la probabilidad de déficit de GH aumenta según el número de déficit hormonales acompañantes (en pacientes con déficit de 3 o 4 hormonas hipofisarias, la probabilidad de déficit de GH es de un 91-100%), de tal forma que en estos pacientes una concentración de factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) disminuido confirmaría el diagnóstico y haría innecesarias las pruebas de estímulo. De todas formas, la prueba de elección, para la mayoría de los autores, es la hipoglucemia insulínica (ITT), siempre que el paciente no tenga antecedentes de cardiopatía isquémica, convulsiones o edad superior a 60 años. El diagnóstico se ha establecido en una respuesta de GH < 3 ng/ml²².

Se ha indicado que la administración combinada de arginina, que reduce la secreción hipotalámica de somatostatina, y somatorrelina (GHRH) constituye un potente estímulo de la secreción de GH y podría ser una alternativa a la ITT. La prueba tiene menos efectos secundarios y está menos influida por la edad o la obesidad. La principal limitación está en los pacientes con DGH de origen hipotalámico, como los que han recibido irradiación, en los que la respuesta puede ser normal. En tales casos, si la ITT está contraindicada, se ha propuesto el uso de arginina sola, poniendo un punto de corte inferior. Recientemente la Endocrine Society ha publicado unas guías de práctica clínica en las que, con base en los resultados obtenidos en estudios multicéntricos, se establece que un punto de corte para la respuesta de GH de 5,1 ng/ml para la prueba de ITT y de 4,1 ng/ml para la prueba de arginina-GHRH tendría suficiente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico del DGH en el adulto²³.

Otros estímulos alternativos podrían ser glucagón, clonidina, levodopa, etc. Todos ellos con menos sensibilidad y especificidad diagnósticas.

El diagnóstico bioquímico de la DGH en el paciente adulto es, si cabe, más controvertido que en el niño. Las pruebas diagnósticas poseen las mismas limitaciones ya comentadas, y en este caso las manifestaciones clínicas son más sutiles e inespecíficas²⁴. Además, la secreción de GH disminuye con la edad, por lo que son necesarios puntos de corte apropiados.

FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA Y SUS PROTEÍNAS DE TRANSPORTE

La medida de la concentración en plasma de los diferentes componentes del sistema IGF, en especial del

IGF-1, es de gran utilidad en el diagnóstico bioquímico de la DGH. Por otra parte, ofrece datos más “robustos” que la propia GH, debido a su mayor estabilidad a lo largo del día. Este tema ha sido tratado recientemente²⁵.

CONCLUSIONES

Como ya se ha dicho, el diagnóstico bioquímico de la DGH sigue siendo un tema controvertido. No existe en la actualidad ninguna prueba bioquímica ni clínica definitiva para el diagnóstico del déficit de GH, tampoco una prueba de referencia. El endocrinólogo debe conocer la especificidad y las limitaciones de los métodos de laboratorio.

Además, la secreción de GH no es un fenómeno de “todo o nada”: no hay un límite preciso que determine la suficiencia o la insuficiencia, sino una graduación continua entre el déficit total y la secreción normal, e incluso los estados transitorios de déficit de GH son un hecho bien documentado.

Los datos bioquímicos deben interpretarse en el contexto clínico y no deben ser utilizados como único criterio para establecer un diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA

- Mauri M, Alfayate R. Problemática en el diagnóstico bioquímico del déficit de hormona del crecimiento. *Endocrinol Nutr.* 2004;51:489-91.
- Granada ML, Sanmartí A, Lucas A, Salinas I, Carrascosa A, Foz M, et al. Assay-dependent results of immunoassayable spontaneous 24-hour growth hormone secretion in short children. *Acta Paediatr Scand.* 1990;370 Suppl:63-70.
- Butler J. Biochemical tests of growth hormone status in short children. *Ann Clin Biochem.* 2001;38:1-2.
- Butler J. Role of biochemical tests in assessing need for growth hormone therapy in children with short stature: Royal College of Pathologists Clinical Audit Project. Disponible en: <http://www.leeds.ac.uk/acb/annals>
- Ayling R. More guidance on growth hormone deficiency. *J Clin Pathol.* 2004;57:123-5.
- Evans C, Gregory JW; on behalf of the all Wales Clinical Biochemistry Audit Group. The investigation of short stature: a survey of practice in Wales and suggested practical guidelines. *Clin Pathol.* 2004;57:126-30.
- Strasburger CJ, Bidlingmaier M. How robust are laboratory measures of growth hormone status? *Horm Res.* 2005;64 Suppl 2:1-5.
- Seth J, Ellis A, Al-Sadie R. Serum growth hormone measurements in clinical practice: an audit of performance from the UK national external quality assessment scheme. *Horm Res.* 1999;51 Suppl:13-9.
- Wood P. Growth hormone: its measurement and the need for assay harmonization. *Ann Clin Biochem.* 2001;38:471-82.
- Standardisation of human growth hormone (hGH) assays. Report of a meeting held at National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire, UK Wednesday, 5th October 2000.
- Tannenbaum GS, Ling N. The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology.* 1984;115:1952-7.
- Sha A, Stanhope R, Matthews D. Hazards of pharmacological tests of growth hormone secretion in childhood. *BMJ.* 1992;304:173-4.
- Yeste D, Tomasini R, Dodino G, Gussinyé M, Potau N, Carrascosa A. Hypoglycaemia-insulin test: discordant growth hormone and cortisol response in paediatric patients regarding recovery from hypoglycaemia with or without oral glucose solution. *Horm Res.* 2007;67:42-5.
- Rodríguez E, Mauri M, Zapico M, López A, Alfayate R, Santos L, et al. Uso racional de las pruebas farmacológicas en el estudio de la reserva de GH en población infantil. *Endocrinol Nutr.* 2004;51 Supl 1:43.
- Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of GH deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3990-3.
- Muller G, Keller A, Reich A, Hoepffner W, Kratzsch J, Buckler JM, et al. Priming with testosterone enhances stimulated growth hormone secretion in boys with delayed puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2004;17:77-83.
- Loche S. Results of early reevaluation of GH secretion in short children with apparent GH deficiency. *J Pediatr.* 2002;140:445-9.
- Chaler E, Belgorosky A, Maceiras M, Mendioroz M, Rivarola MA. Between-assay differences in serum growth hormone (GH) measurements: Importance in the diagnosis of GH deficiency in childhood. *Clin Chem.* 2001;47:1735-8.
- Mörsky P, Tiikkainen U, Ruokonen A, Markkanen H. Problematic determination of serum growth hormone: Experience from external quality assurance surveys 1998-2003. *Scand J Clin Lab Invest.* 2005;65:377-86.
- Martínez de Osaba MJ, Mauri M. Exploraciones funcionales para valorar el eje de la hormona somatotropa y de los factores de crecimiento similares a la insulina. En: Audí L, Granada ML, Berlanga E, editores. Estudio de la función somatotropa en el laboratorio clínico. Barcelona: Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2005. p. 67-77.
- Spiliotis BE, August GP, Hung W, Sonis W, Mendelson W, Bercu B. Growth hormone neurosecretory dysfunction: a treatable cause of short stature. *JAMA.* 1984;251:2223-30.
- Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of adults with GH deficiency: summary statement of the GH Research Society workshop on adult growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:379-81.
- Molitch ME, Clemmons DR, Malozowshi S, Merriam GR, Shalet SM, Vance ML, et al. Clinical practice guideline. Evaluation and treatment of adult growth hormone deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:1621-34.
- Torres E, Leal-Cerro A, Casanueva FF. Diagnóstico del déficit de hormona del crecimiento en pacientes adultos. *Endocrinol Nutr.* 2002;49:313-5.
- Granada ML. Factor de crecimiento similar a la insulina y sus proteínas de transporte. *Endocrinol Nutr.* 2006;53:467-75.