

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**AVALIAÇÃO DA MEDIDA DA SUBUNIDADE ALFA LIVRE
DOS HORMÔNIOS GLICOPROTÉICOS NO
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE RETARDO
CONSTITUCIONAL DO CRESCIMENTO E
DESENVOLVIMENTO PUBERAL E HIPOGONADISMO
HIPOGONADOTRÓFICO NO SEXO MASCULINO**

ALBERTO SCOFANO MAINIERI

PORTO ALEGRE
2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**AVALIAÇÃO DA MEDIDA DA SUBUNIDADE ALFA LIVRE
DOS HORMÔNIOS GLICOPROTÉICOS NO
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE RETARDO
CONSTITUCIONAL DO CRESCIMENTO E
DESENVOLVIMENTO PUBERAL E HIPOGONADISMO
HIPOGONADOTRÓFICO NO SEXO MASCULINO**

ALBERTO SCOFANO MAINIERI

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. REGINA HELENA ELNECAVE

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina: endocrinologia como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Endocrinologia.

PORTO ALEGRE
2000

Dedico este trabalho a minha esposa e filhos por todo o apoio que me deram e pela demonstração de respeito, afeto e compreensão ao abdicarem do convívio comigo em prol de minha realização pessoal e profissional, mesmo sabendo que os anos que se foram não serão mais recuperados.

AGRADECIMENTOS

À Silvana, minha esposa, e meus filhos Clarissa e Maurício pelo apoio que sempre me deram, pela paciência e compreensão em dividir, com este trabalho, o tempo que deveria ter sido dedicado a eles.

Aos meus pais pelo esforço incansável para dar aceso ao ensino, alicerçando nossos passos nas mais sólidas bases morais, que viabilizaram atingir as metas por mim almejadas até hoje.

À Dr.^a Regina Helena Elnecave pela confiança e esperança que sempre depositou em meu trabalho e pela paciência e dedicação na dura arte de fazer este pediatra entender de endocrinologia. Ensinar é uma arte que poucos dominam, e nisto ela também é doutora.

Ao Dr. Ércio Amaro de Oliveira pelo incentivo que sempre deu ao crescimento profissional da equipe da Clínica para Adolescentes do H.C.P.A.

Aos 102 meninos e adolescentes e aos 44 adultos que, aceitando realizar o teste hormonal, viabilizaram este estudo.

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| 1- INTRODUÇÃO | 01 |
| 2- ARTIGO 1 | 11 |
| 2.1- ABSTRACT | 13 |
| 2.2- RESUMO | 14 |
| 2.3- INTRODUÇÃO | 15 |
| 2.4- PACIENTES E MÉTODOS | 17 |
| 2.5- RESULTADOS | 20 |
| 2.6- DISCUSSÃO | 23 |
| 3- ARTIGO 2..... | 26 |
| 3.1- ABSTRACT | 28 |
| 3.2- RESUMO | 30 |

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| 3.3- INTRODUÇÃO | 32 |
| 3.4- PACIENTES E MÉTODOS | 34 |
| 3.5- RESULTADOS | 38 |
| 3.6- DISCUSSÃO | 43 |
| 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS | 48 |
| 5- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 52 |

ANEXOS

I- TERMO DE CONSENTIMENTO

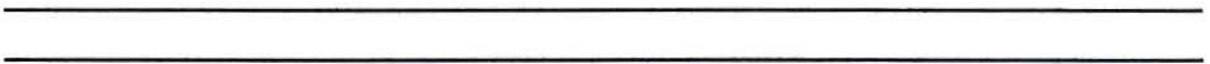
II- CARACTERÍSTICAS DOS INDIVÍDUOS AVALIADOS

III- RESULTADOS INDIVIDUAIS DOS TESTES

IV- ARTIGO 1 ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

V- ARTIGO 2 FORMATADO PARA PUBLICAÇÃO

INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO

A puberdade é uma fase do desenvolvimento humano caracterizada pelo surgimento dos caracteres sexuais secundários concomitantemente à aceleração da velocidade de crescimento. Através desse processo, o organismo atinge sua forma e capacidade funcionais adultas. As modificações genitais dessa fase, que capacitam o organismo à reprodução, são consequência das alterações no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (H-H-G), como descreve-se a seguir.

No hipotálamo, ao nível do núcleo arqueado, ocorre a síntese do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), liberado em pulsos, exclusivamente na circulação porta-hipofisária (40). O GnRH age sobre a hipófise promovendo a síntese e a liberação das gonadotrofinas: hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH).

As gonadotrofinas hipofisárias, assim como a gonadotrofina coriônica e a tireotrofina (TSH) são hormônios glicoprotéicos constituídos de duas subunidades: alfa e beta. A subunidade alfa ($SUB\alpha$) é comum a todos os hormônios glicoprotéicos. A atividade específica de cada um deles é estabelecida pela subunidade beta (36, 40). A síntese de LH envolve várias etapas. Entre elas, estão a síntese da $SUB\alpha$ e da $LH\beta$ (36).

A subunidade β é produzida em menor quantidade (24, 38) , sendo, por isso, fator limitante na síntese do LH (33). A hipófise só responde ao estímulo do GnRH quando ele for pulsátil. A partir desse momento, gerará também a liberação pulsátil de LH e FSH (2, 40). As gonadotrofinas agem sobre as gônadas, promovendo a secreção dos esteróides sexuais, que atuam sobre os tecidos e órgãos-alvo, ocasionando as mudanças físicas típicas do período pubertário e a gametogênese.

No testículo, o LH age principalmente sobre as células de Leydig (provoca a secreção de testosterona). O FSH age mais especificamente sobre as células de Sertoli (promove a maturação dos espermatozóides e concomitante síntese e liberação de inibina). Além das ações descritas acima, as gonadotrofinas atuam como parte do "feedback" negativo sobre o hipotálamo, reduzindo a secreção de GnRH (4, 40, 57).

O sistema nervoso central (SNC), por sua vez, exerce o controle intrínseco, em que neurotransmissores, neuromoduladores e fatores metabólicos agem sobre os neurônios produtores de GnRH e alteram a síntese e liberação deste hormônio (40) .

Os neurônios produtores de GnRH têm origem embriológica no núcleo olfatório e migram até o núcleo arqueado durante as primeiras semanas de vida intra-uterina (50). Já a partir da 11ª semana, o hipotálamo secreta GnRH com conseqüente liberação de LH e FSH pela hipófise (46). No final da gravidez, os níveis de LH e FSH do feto diminuem devido à redução do GnRH e ao aumento da produção de esteróides sexuais pela unidade feto-placentária (40, 50).

Até 6 meses de vida (no sexo masculino) e 12 meses - no sexo feminino (7), ainda existem aumentos transitórios de gonadotrofinas e de esteróides sexuais.

Inicia-se, a partir daí, um longo período em que o eixo H-H-G será mantido hipofuncionante devido não só à inibição intrínseca do SNC sobre o hipotálamo como também ao aumento da sensibilidade hipotalâmica/hipofisária ao “feedback” negativo exercido pelos esteróides sexuais. Verificam-se, então, baixos níveis séricos de LH e FSH (40).

Além disso, alguns estudos demonstram, mesmo em crianças pré-púberes, um padrão pulsátil de secreção de gonadotrofinas com pulsos de baixa frequência e amplitude (23, 40). Aproximadamente dois anos antes do surgimento dos primeiros sinais físicos de puberdade, a função do eixo H-H-G aumenta gradualmente e é expressa pelo aumento da amplitude e da frequência dos pulsos de GnRH, com conseqüente aumento da secreção de LH e FSH (6, 34, 56).

Essa reativação do eixo H-H-G leva à maturação sexual que corresponderá à puberdade (6). Através da utilização de ensaios pouco sensíveis, demonstrou-se que os níveis séricos de $SUB\alpha$ também estão: elevados no recém-nascido, próximos ao limite de detecção dos ensaios na infância e aumentam gradualmente do período pubertário até a vida adulta (13, 45).

O primeiro sinal físico de puberdade, no sexo feminino, é o surgimento do botão mamário e, no sexo masculino, é o aumento do volume testicular. Habitualmente essas modificações surgem entre os 8 e 13 anos de idade (média 10,5 anos) nas meninas e entre os 9 e 14 anos de idade (média 11,5 anos) nos meninos (32). Tais médias e limites foram determinados em vários estudos, com pequenas variações (5, 7, 8, 12,16).

Como os limites acima descritos baseiam-se em dois desvios-padrão de distanciamento da média, considera-se como atraso puberal os casos em que não

há sinais iniciais de puberdade após os limites superiores de idade acima propostos. Este tipo de alteração ocorre em cerca de 3% das crianças normais (50).

A causa mais freqüente do atraso puberal no sexo masculino é o Retardo Constitucional do Crescimento e Desenvolvimento Puberal (RCCDP) - corresponde a 95% dos casos. No sexo feminino, é a segunda causa (responsável por 16% dos casos) (55). São indivíduos com atraso de desenvolvimento físico que permanecem fisiologicamente imaturos por mais tempo. Nesses casos, o início das modificações hormonais e físicas da puberdade ocorre espontaneamente, porém mais tarde (16).

O atraso puberal pode ser uma manifestação de hipogonadismo hipogonadotrófico (HH), caracterizada pela insuficiência ou ausência de secreção pulsátil de GnRH e/ou LH e FSH, levando à falta de estímulo sobre as gônadas e conseqüente hipodesenvolvimento dos caracteres sexuais secundários (10, 16, 49). A deficiência de gonadotrofinas ou de GnRH pode ter múltiplas causas. Nos indivíduos com HH, a concentração sérica de gonadotrofinas pode variar desde níveis indetectáveis até pulsos comparáveis aos encontrados no período peripuberal normal (9, 37, 50).

Alguns indivíduos com HH podem apresentar aumento inicial do volume testicular, mas não demonstrar progressão subseqüente da puberdade. Assim, são considerados portadores de HH parcial. Kulin descreve-os como pacientes que apresentam início da puberdade na época normal ou tardia. Podem demonstrar elevação inicial das gonadotrofinas, sem, no entanto atingir os níveis de adulto (25).

Nas crianças normais pré-púberes, os níveis de gonadotrofinas e esteróides sexuais são baixos (13), devido à inibição da atividade do eixo H-H-G. As semelhanças nos achados clínicos e hormonais de pacientes com HH e meninos

pré-púberes com RCCDP tornam o diagnóstico diferencial ainda mais difícil antes dos 18 anos de idade. Define-se como hipogonadismo quando, após esta idade, há ausência de sinais ou de progressão da puberdade (9, 50, 58).

Pacientes com HH parcial podem ser confundidos por longo tempo com jovens normais em puberdade. Pacientes com deficiências de outros hormônios hipotalâmicos e/ou hipofisários podem ter hipogonadismo, o que torna o diagnóstico ainda mais difícil, pois tanto o déficit de hormônio do crescimento como o hipotireoidismo causam retardamento na maturação óssea e conseqüente atraso puberal.

A avaliação endocrinológica do paciente que vive esta situação e suspeita de HH é feita com base no estudo do funcionamento do eixo H-H-G. Os níveis séricos de GnRH não são medidos, já que esse hormônio está presente quase exclusivamente na circulação porta-hipofisária. As dosagens basais das gonadotrofinas, quando elevadas, caracterizam os casos de falência gonadal primária, porém não são úteis na diferenciação do RCCDP e do HH, já que, em ambos, os níveis basais de gonadotrofinas estão baixos (11).

Com a síntese química do GnRH (GnRHs), tornou-se possível seu uso para o estudo da fisiologia e fisiopatologia das perturbações do eixo H-H-G (17, 20). A injeção endovenosa desse hormônio, com análise da variação das concentrações séricas de LH e FSH antes e após seu uso, constitui-se num teste de estimulação das gonadotrofinas hipofisárias. O teste mais comumente utilizado envolve a injeção endovenosa de 100µg de GnRHs com coletas de sangue aos zero, 30 e 60 minutos após o estímulo (1).

É comprovado que o pico máximo de elevação do LH ocorre entre 30 e 45 min e o do FSH entre 60 e 90 min (1, 17). Com isso, as coletas aos 30 e 60 minutos após o estímulo possibilitam a detecção do aumento tanto do LH (aos 30 min) como do FSH (aos 60 min). Em adultos, os testes de estímulo são úteis para o estabelecimento do diagnóstico de HH, pois a resposta dos hipogonádicos é marcadamente menor que a dos adultos normais (9). A SUB α também pode ser medida nesse teste.

A interpretação desses testes com base nos níveis séricos da gonadotrofinas, no momento da avaliação diagnóstica do atraso puberal em indivíduos do sexo masculino (antes dos 18 anos de idade) é difícil. O eixo H-H-G pode estar fisiologicamente hipofuncionante nessa fase (19), sobrepondo-se os resultados aos encontrados nos pacientes com HH (16, 17, 19, 39, 41, 50, 57).

Outros testes têm sido propostos para avaliar as mudanças do LH e do FSH, tanto espontâneas como após estímulos, na intenção de diferenciar o HH do RCCDP (11, 15, 16, 17, 26, 35, 39, 43, 55, 57). As múltiplas dosagens sanguíneas, com tempo de teste prolongado (11, 15, 57), o uso de agonistas (de custo mais elevado que o GnRHs) para o estímulo (14) e sobretudo, a sobreposição dos resultados (30, 43), fazem com que estes testes sejam inadequados para o uso na prática clínica.

A SUB α é produzida tanto nos gonadotrofos como nos tireotrofos (52). O gonadotrofo é o principal local de síntese da SUB α (54) e o GnRH exerce marcante influência na sua liberação (44). A transcrição gênica das subunidades α e β do LH e FSH correlaciona-se à frequência dos pulsos do GnRH (18). Existe correlação entre a secreção do LH e da SUB α (42, 44, 51).

Constatou-se inclusive, que 40% dos pulsos da SUB α ocorrem antes, 54 % concomitantemente e 6 % após os do LH (53). Os adultos normais e pacientes com HH têm secreção pulsátil de SUB α (53, 54) havendo concomitância dos pulsos de LH e da SUB α (após estímulo com GnRH). A amplitude dos pulsos da SUB α , apresenta-se, assim, significativamente maior nos indivíduos normais (51).

Homens jovens púberes e homens adultos respondem com elevação dos níveis séricos de SUB α ao teste de estímulo com GnRHs, mas as crianças pré-púberes apresentaram níveis próximos ou abaixo do limite de detecção do ensaio (45). O controle da secreção da SUB α difere, em parte, daquele do LH, já que determinados estímulos inibidores da secreção do LH não interferem na secreção da SUB α .

Em estudos realizados, observou-se que a utilização de um antagonista do GnRH em homens reduz 75% dos níveis de LH em dois dias, com redução de no máximo 50% dos níveis séricos da SUB α após sete dias de tratamento (29). Um agonista do GnRH (Buserelina) diminuiu os níveis séricos do LH β e o LH bioativo em mulheres com endometriose após uma semana, enquanto os níveis da SUB α elevaram-se. Tal efeito persistiu por todo o período do tratamento (28).

O uso de um agonista do GnRH em meninas com puberdade precoce suprimiu os níveis de LH, mas não da SUB α após 12 meses de tratamento (27). Diz-se, então, que o agonista conseguiu suprimir a formação do LH (principalmente pela diminuição da produção da subunidade β). Contudo, não reduziu todas as funções do gonadotrofo, visto que os níveis da SUB α permaneceram elevados.

Em um estudo prévio, avaliamos a resposta das gonadotrofinas e da SUB α após estímulo com GnRH em meninos pré-púberes de 6-8 anos de idade (com o eixo H-H-G fisiologicamente suprimido) e em homens com HH completo (com o eixo H-H-G suprimido por patologia) (30). Demonstramos que os níveis séricos do LH, FSH, da SUB α 30 e 60 minutos e o pico após o estímulo, diferenciam estatisticamente os dois grupos, porém com sobreposição dos valores pertencentes ao intervalo de 95% de confiança.

Esta sobreposição mostra-se menos evidente na SUB α . Os valores basais são estatisticamente iguais nos dois grupos. A análise dos valores relativos - o delta (pico menos basal) e a razão (pico dividido pelo basal) - entre os níveis séricos da SUB α diferenciam os dois grupos sem sobreposições. Estes achados indicam a possibilidade do uso da SUB α no desenvolvimento de um teste para o diagnóstico diferencial entre o RCCDP e HH.

No entanto, alguns pontos merecem ser melhor avaliados. O grupo de indivíduos normais estudado (meninos entre 6 e 8 anos de idade) permite-nos inferir que indivíduos cujo eixo H-H-G encontra-se fisiologicamente suprimido respondem ao teste de estímulo com maior variação na liberação da SUB α do que indivíduos com HH completo, mas não nos demonstra se jovens com idade superior ou mais próxima da puberdade, época em que o eixo H-H-G está sendo reativado, terão a mesma resposta. A dúvida quanto à integridade ou não do eixo H-H-G habitualmente surge na prática clínica em indivíduos sem ou com pouco desenvolvimento puberal em idade próxima ou superior a 14 anos.

A SUB α é produzida também no tireotrofo (52) e o grupo de pacientes com HH do nosso estudo (30) foi composto, em sua maioria, por pacientes com HH completo

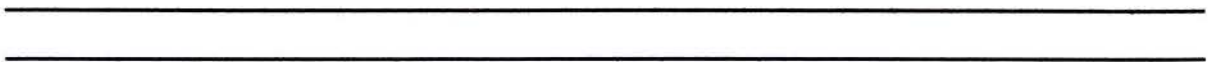
associado a outras deficiências de hormônios hipotálamicos e/ou hipofisários. Cabe ressaltar que alguns deles faziam uso de T_4 .

Estudos demonstraram que os níveis séricos de $SUB\alpha$ não se alteraram após a supressão do TSH pelo T_4 em indivíduos com deficiência exclusiva de gonadotrofinas (54), os níveis basais da $SUB\alpha$ em homens normais são três vezes maiores que os de adultos com deficiência exclusiva de gonadotrofinas e a resposta ao teste de estímulo com hormônio estimulador da tireotrofina (TRH) provoca incremento igual dos níveis de $SUB\alpha$ nos dois grupos (52).

Frente a estes dados e sabendo que o GnRH é o principal secretagogo da $SUB\alpha$ (44), supõe-se que a inclusão de indivíduos usando T_4 no grupo de pacientes com HH não tenha interferido nos resultados. Todavia, seria válido comparar as variações da $SUB\alpha$ a um grupo composto apenas por pacientes com HH isolado. Na prática clínica, a maioria dos pacientes com atraso puberal não possui deficiência de outros hormônios, evidenciando apenas baixos níveis séricos de gonadotrofinas e testosterona.

Levando em consideração que o atraso puberal ocorre em 3% da população, o RCCDP é mais freqüente no sexo masculino, existe a necessidade de se estabelecer o diagnóstico diferencial entre RCCDP e HH, que não há um teste diagnóstico eficaz e viável para o uso na prática clínica e com base nos resultados obtidos em nosso estudo anterior, resolvemos aprofundar a investigação sobre o potencial de utilização da $SUB\alpha$ no diagnóstico do HH.

ARTIGO 1



ARTIGO 1

HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO É DIAGNOSTICADO PELO VALOR DA RAZÃO ENTRE O PICO E O BASAL DA SUBUNIDADE α LIVRE (PBR α)

Dr. ALBERTO SCOFANO MAINIERI

Unidade Clínica para Adolescentes

Serviço de Pediatria

Dr.^a REGINA HELENA ELNECAVE

Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) - Porto Alegre, RS, Brasil

HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO E PBR α

ABSTRACT

It has been shown that the relationship between the peak GnRH-stimulated and the basal serum levels of the Free α -Subunit (FAS) differentiates men with Hypogonadotropic Hypogonadism (HH) from normal prepubertal boys. The aim of this study is to evaluate the test performance for diagnostic purposes.

FAS levels of 34 healthy prepubertal males and 38 men with HH were measured before, 30 and 60' after an IV bolus of GnRH. Peak/Basal Ratio of Free α -Subunit. (PBR α), the maximal serum level of FAS (Peak) divided by its basal level (Basal) was evaluated. Performance measurements, i.e., sensitivity and specificity, was evaluated by the ROC curve.

Individual data of every normal subject and patient with HH determined the area under the ROC curve of 0.992. PBR α \leq 3.26 define HH with 94.7% sensitivity and 94.1% specificity.

The high sensitivity and specificity found are capable to identify individuals with HH, allowing the use of PBR α in clinical practice. The capacity to release FAS may be a better marker of pituitary gonadotropic function than that of intact LH.

KEY WORDS

Free α - Subunit; hypogonadotropic hypogonadism; delayed puberty

RESUMO

A razão entre o pico, após estímulo com GnRH, e os níveis séricos basais da subunidade alfa livre dos hormônios glicoprotéicos (SUB α), diferencia homens com hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) de meninos pré-púberes normais. O objetivo deste estudo é avaliar o desempenho deste teste para fins diagnósticos.

Os níveis séricos da SUB α antes, 30' e 60' após aplicação endovenosa única de GnRH foram medidos em 34 homens pré-púberes saudáveis e em 38 homens com HH. Foram avaliados os valores da PBR α - nível sérico máximo da SUB α divididos pelo nível basal. As medidas de desempenho, i.e. (sensibilidade e especificidade) foram avaliadas pela Curva ROC.

Os dados individuais sobre todos os indivíduos normais e pacientes com HH determinaram uma área sobre a curva ROC de 0,992. Valores da PBR α \leq 3.26 definem o HH com 94.7% de sensibilidade e 94.1% de especificidade.

A alta sensibilidade e especificidade encontrada é capaz de identificar indivíduos com HH, permitindo o uso da PBR α na prática clínica. A capacidade de liberar SUB α pode ser um marcador melhor da função gonadotrófica hipofisária do que a de LH intacto.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico do Hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) em homens antes dos 18 anos de idade é difícil, visto que as características clínicas e hormonais são similares às encontradas no Retardo Constitucional do Crescimento e Desenvolvimento Puberal (RCCDP) (9, 50).

O atraso puberal ocorre em 3% das crianças normais (50). O RCCDP é mais comum em homens. Corresponde a 95% das causas de atraso puberal (55). No RCCDP, o início das transformações físicas e hormonais da puberdade ocorre tardiamente, embora de forma normal (16). Os níveis séricos de gonadotrofinas, por sua vez, permanecem baixos até que estas modificações iniciem-se.

O HH também é caracterizado pelo hipodesenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e baixos níveis de gonadotrofinas, que ocorrem devido à ausência ou insuficiência de secreção do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) e / ou do Hormônio Luteinizante (LH) e Folículo Estimulante (FSH) propriamente dito (16). O diagnóstico clínico definitivo de HH em homens só é estabelecido quando atingem a idade de 18 anos sem sinais iniciais ou de progressão da puberdade (58).

Vários estudos têm avaliado as mudanças do LH e FSH, tanto espontâneas como após estímulo, visando a diferenciar HH do RCCDP (11, 15, 16, 17, 26, 35, 39, 43, 55, 57). Múltiplas coletas sanguíneas e teste por tempo prolongado (11, 15, 36),

custo elevado das drogas usadas para o estímulo (14) e, sobretudo, a sobreposição dos resultados (43), tornam estes testes inadequados para a prática clínica.

Descrevemos anteriormente que a relação entre o pico após estímulo com GnRH e o nível sérico basal da subunidade alfa livre ($SUB\alpha$) é maior em meninos normais, entre 6 e 8 anos de idade (controles) que em adultos com HH, sem sobreposição dos resultados (30).

O objetivo deste estudo é validar este teste, usando uma amostragem maior de homens com HH, tendo como grupo controle meninos pré-púberes normais e indivíduos com RCCDP.

PACIENTES E MÉTODOS

Este teste diagnóstico foi realizado em 34 indivíduos normais e em 38 homens com HH.

Foram estudados como controles 34 homens com idade entre 8 e 16 anos, todos testados quando não apresentavam qualquer evidência de sinais físicos da puberdade e acompanhados até que sua puberdade houvesse iniciado.

Em 17 deles, a puberdade iniciou antes do 14 anos de idade e, em 17, após completarem 14 anos (considerados como RCCDP) . Todos apresentavam o crescimento adequado para a idade cronológica ou idade óssea. Eram sadios e não apresentavam doenças orgânicas que pudessem interferir no desenvolvimento do processo.

Indivíduos com história de doenças crônicas, síndromes genéticas, tumores cerebrais, traumatismo, cirurgia ou radioterapia craniano, usuários de anticonvulsivantes ou preparações contendo hormônios foram excluídos da amostragem.

O grupo de pacientes com HH foi composto por 38 homens com idade entre 16 e 39 anos que, após os 18 anos, apresentavam volume testicular inferior a 4 ml ou não apresentavam sinais de progressão da puberdade por um período superior a 24 meses e tinham níveis séricos de gonadotrofinas baixos.

Neste grupo, 26 possuíam panhipopituitarismo e faziam reposição hormonal, 2 possuíam panhipopituitarismo e não faziam reposição hormonal e 10 tinham HH isolado. Nenhum havia feito uso de testosterona nos 5 meses que antecederam o teste. No momento do teste, todos os pacientes eram pré-púberes ou não apresentavam evolução na puberdade.

Foram excluídos os pacientes com tumores na região hipotálamo-hipofisária ou submetidos à cirurgia desta região e aqueles que realizaram radioterapia craniana. Acompanharam-se todos os pacientes até a confirmação clínica do diagnóstico de HH. Em alguns casos, o acompanhamento estendeu-se por 4 anos.

O teste envolveu a determinação da Razão entre o Pico e o Basal da Sub α (PBR α) após uma única aplicação endovenosa de GnRH. PBR α é o valor determinado pela divisão (Razão) do nível sérico máximo atingido após o estímulo (Pico) pelo nível sérico basal (Basal).

As coletas sanguíneas para a determinação da SUB α foram feitas antes (basal), 30 e 60 minutos após aplicação endovenosa de 100 μ g GnRH (RELISORM® L, Serono; Barueri, SP). O soro foi congelado a -20°C e armazenado até a realização das dosagens de SUB α que foram feitas em duplicata usando ensaio imunofluorimétrico descrito previamente (48), com CV intra ensaio $< 5\%$ e CV entre ensaio = 5%.

O nível mínimo de detecção do ensaio é para SUB α = 4ng/L. O padrão foi calibrado pelo 1º IRP, [78/569] (National Institute for Biological Standards and Control, Potter Bar, UK.). Foram referidas as medianas e os limites dos intervalos nos percentis 25 e 75 (P25-P75). Calcularam-se as medidas de desempenho do

teste, i.e., sensibilidade e especificidade. O intervalo de confiança foi determinado pela distribuição binomial.

Calculou-se, então, a curva ROC (Receiver Operating Characteristics) (3) e apresentou-se o resultado com o intervalo de confiança de 95%, média e erro padrão ($\bar{x} \pm EP$). Os dados foram analisados e processados com o auxílio do programa MEDCALC®. Este estudo foi aprovado pelo IRB do nosso hospital. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento informado.

RESULTADOS

Nos indivíduos normais, a mediana (P25-P75) dos valores da Razão entre o Pico e o Basal da SUB α (PBR α) foi 7,25 (6,00-10,53). Em 5 destes indivíduos, o valor da PBR α foi inferior ao maior valor obtido em um paciente com HH. (Fig. 01)

Nos pacientes com HH, a mediana (P25-P75) dos valores da PBR α foi 2,06 (1,56-2,73). Em 4 deles, os valores da PBR α foram superiores ao menor valor apresentado por um indivíduo normal. (Fig. 01)

Os valores individuais da PBR α de todos os indivíduos normais e pacientes com HH determinaram uma área sob a curva ROC de 0,934 to 0,996 (0,992 \pm 0,011). (Fig. 02).

PBR α \leq 3.09 define HH com 89,5% (75,2-97,0) sensibilidade e 100,0% (100,0-100,0) especificidade. PBR α \leq 4.81 define HH com 100,0% (100,0-100,0) sensibilidade e 85,3% (68,9-95,0) especificidade. O ponto de corte que associa a maior sensibilidade à maior especificidade é com PBR α = 3.26. PBR α \leq 3.26 define HH com 94,7% (82,6-99,2) sensibilidade e 94,1% (80,3-99,1) especificidade.

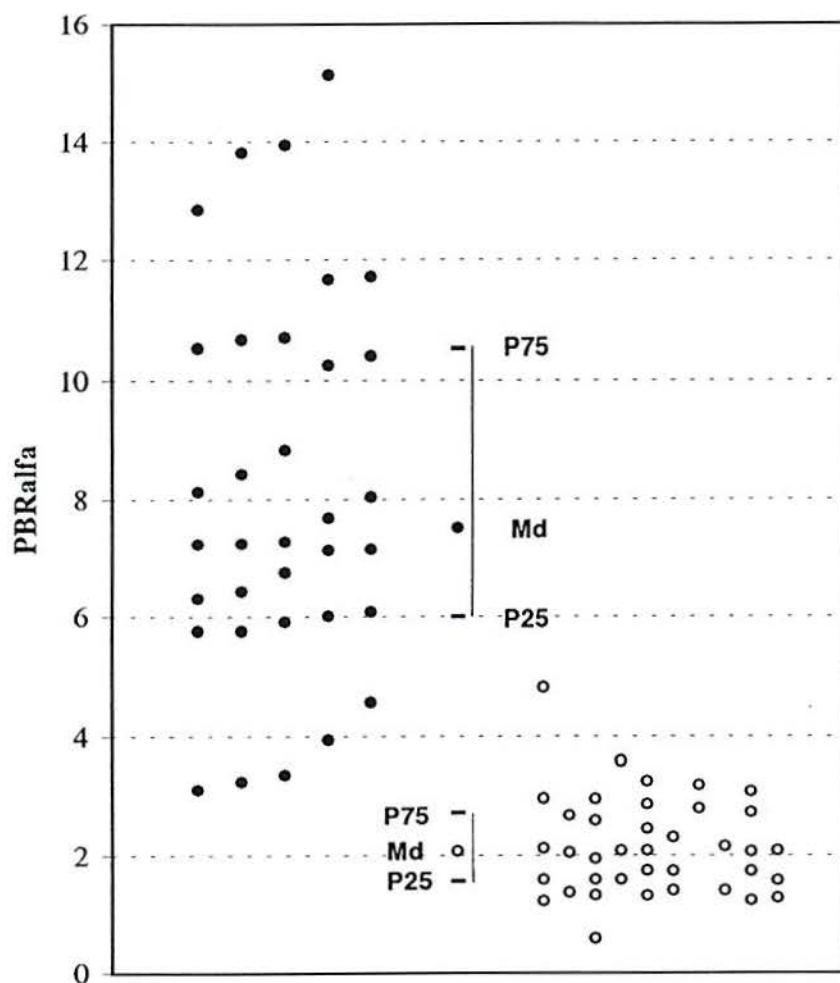


Fig. 01 – Valores da PBR_{α} de cada indivíduo avaliado nos grupos de pacientes com Hipogonadismo Hipogonadotrófico (O) e indivíduos pré-púberes normais (●), com as respectivas medianas e intervalos entre os percentis 25 (P25) e 75 (P75).

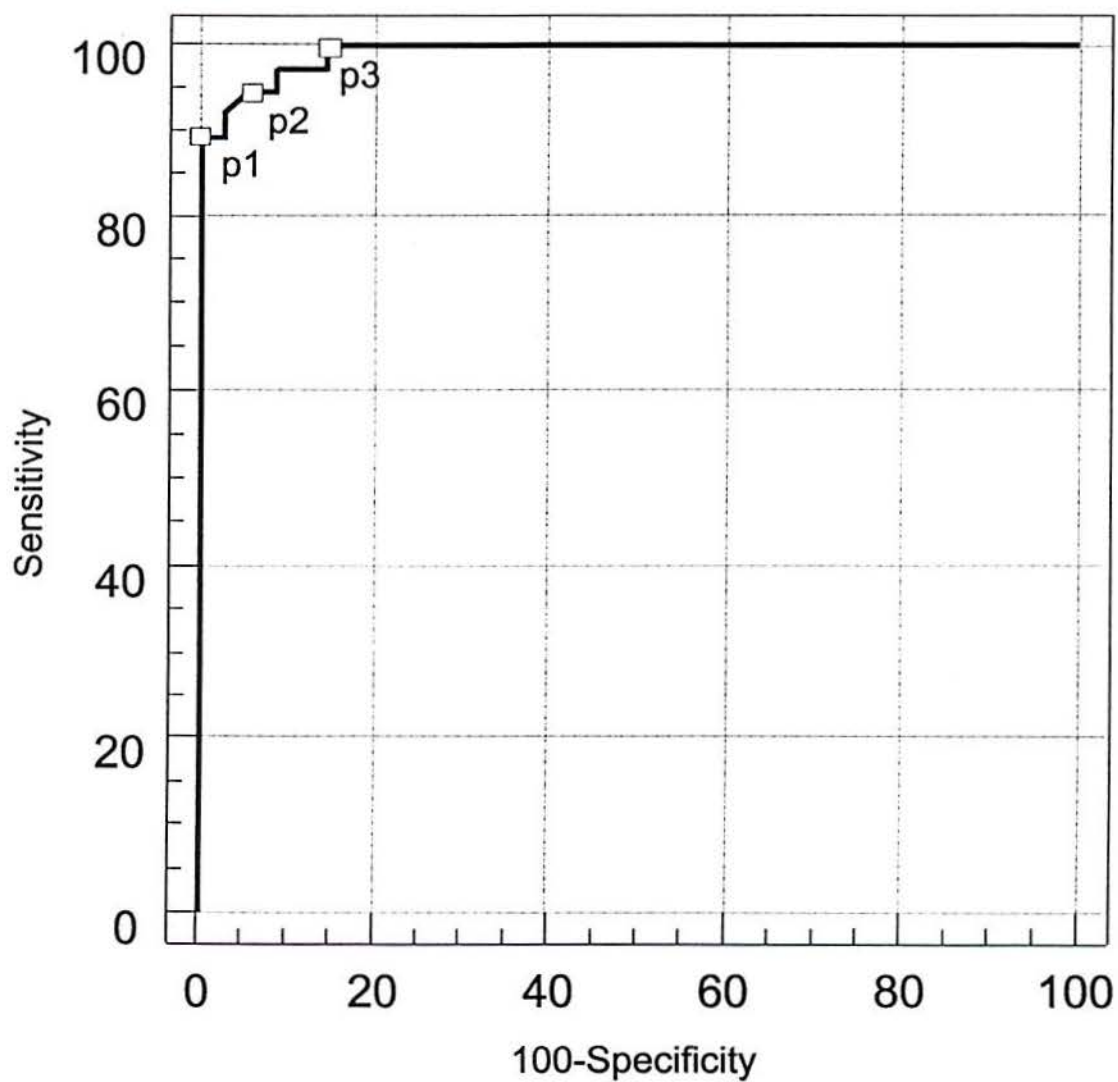


Fig. 02 – Curva ROC com os valores da PBR α (n = 72), com os pontos de corte: p1 = 3.09; p2 = 3.26; p3 = 4.81

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a avaliação da resposta relativa dos níveis séricos da subunidade alfa livre ($SUB\alpha$) é um preciso método de diagnóstico do HH. Os resultados acima mostram que a Razão entre o Pico e o Basal da $SUB\alpha$ ($PBR\alpha$) garante a distinção entre meninos pré-púberes normais e indivíduos com HH e valores da $PBR\alpha < 3.26$ definem o HH com 5.3% de resultados falso-negativos e 5.9% de falso-positivos.

Um teste robusto como este com elevada sensibilidade e especificidade diagnóstica o HH em homens pré-púberes em quase todos os casos. A existência de sobreposição em apenas 12,5% do total de indivíduos avaliados, ocorrida em um intervalo pequeno dos valores da $PBR\alpha$ (3,09-4,81), não inviabiliza sua aplicação na prática clínica (Fig. 01).

Os resultados mostram que valores da $PBR\alpha \leq 4.81$ diagnosticam o HH sem resultados falso-negativos e com apenas 14,7% de resultados falso-positivos. Os valores da $PBR\alpha < 3.09$, por sua vez, diagnosticam o HH sem resultados falso-positivos e com apenas 10,5% de falso-negativos.

O grupo controle incomum, composto por meninos normais pré-púberes e homens com RCCDP, ambos com hipogonadismo hipogonadotrófico funcional transitório, permite a equivalência funcional dos dois grupos. A escolha foi importante, pois, no momento da realização do teste, todos os indivíduos eram

cl clinicamente hipogonádicos. Em uns, porém, a puberdade viria a se desenvolver normalmente; em outros, não.

A semelhança entre o padrão de secreção da SUB α e das gonadotrofinas hipofisárias justificam o estudo da liberaçãõ da SUB α após estímulo com GnRH. As gonadotrofinas hipofisárias e a gonadotrofina coriônica são hormônios glicoprotéicos compostos por duas subunidades, α e β . A primeira é comum a todas elas (36).

Embora seja sintetizada no gonadotrofo e no tireotrofo, o primeiro é que sintetiza a maior quantidade (52, 54). O GnRH exerce marcante influência na secreção da SUB α (44) e há significativa correlaçãõ entre a secreção do LH e FSH e da SUB α (42, 44, 45, 51, 53, 54). A SUB α é secretada em pulsos tanto em homens adultos normais (53) como em pacientes com HH (54); no entanto, a amplitude dos pulsos do SUB α é significativamente maior em indivíduos normais (51, 52).

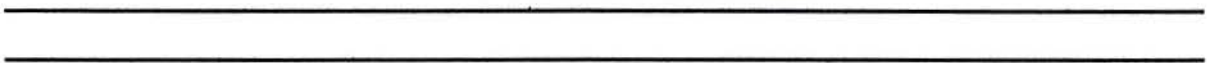
Até então, nenhum teste simples confiável possibilita identificar o HH antes dos 18 anos de idade. O grande poder discriminatório da SUB α quando comparado com o LH e o FSH pode ser decorrente de algumas diferenças existentes entre as gonadotrofinas intactas e a SUB α . Apesar da existênciã de correlaçãõ entre a secreção de ambas (42, 44, 45, 53, 54), foram descritas respostas diferentes a um mesmo estímulo (18, 28).

Assim, um antagonista do GnRH inibe a secreção do LH com pequeno ou nenhum efeito sobre a SUB α (27, 28, 29). Foi demonstrado que a hipófise sintetiza quantidades maiores de SUB α que de subunidade beta (22, 38) numa proporção de até 8 vezes mais (24), sendo a subunidade beta a limitante da síntese da LH (33).

Assim, a capacidade de liberar a $SUB\alpha$ pode ser um melhor marcador da função gonadotrófica hipofisária do que o LH ativo. Em pacientes com HH hipotalâmico, a ausência de resposta hipofisária e a estimulação aguda podem ser decorrentes da falta de estimulação prévia da glândula (47).

Em conclusão, a dosagem da $SUB\alpha$ após GnRH e o cálculo da $PBR\alpha$ são um preciso método de diagnóstico do HH em homens fisicamente imaturos. O uso deste teste em mulheres e homens em idades diferentes das avaliadas neste estudo aguarda estudos posteriores.

ARTIGO 2



ARTIGO 2

VALOR DA PBR α NA AVALIAÇÃO DO ATRASO PUBERAL EM HOMENS

Dr. ALBERTO SCOFANO MAINIERI

Unidade Clínica Para Adolescentes

Serviço de Pediatria

Dr.^a REGINA HELENA ELNECAVE

Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) - Porto Alegre, RS, Brasil

ATRASO PUBERAL E SUBUNIDADE ALPHA

ABSTRACT

Introduction

In recent studies we have demonstrated that PBR α (Peak/Basal Ratio of the Free Alpha Subunit of glycoprotein hormones - FAS - after GnRH) identify Hypogonadotropic Hypogonadism (HH) in pre-pubertal males with high sensitivity and specificity.

In this study we assess the performance of PBR α in normal men of different ages and pubertal development and in patients with HH, both isolated and combined to other hypothalamic and/or pituitary hormone deficiencies.

Material and Methods

The serum levels of FAS before, 30 and 60 minutes after 100 ug IV GnRH were measured in males: 84 normal pre-pubertal 6 -13 yr-old boys, 18 Constitutional Delay of Growth and Puberty (CDGP) subjects, 13 patients with complete isolated HH (IcHH), 21 patients with complete HH combined to other deficiencies (CcHH) and 10 patients with partial HH combined to other deficiencies (CpHH).

Results

Median PBR α of CDGP subjects (7.46) is significantly greater than those of IcHH patients (2.73), CcHH (1.58) and CpHH (2.41) ($p < 0,001$).

PBR α values ≤ 3.26 identify patients with HH with 93,2% de sesitivity and 94,4% specificity, when compared to CDGP subjects.

The medians of PBR α of normal pre-pubertal 6-8 yr-old (7.20), 8-13 yr- old (8.71) boys, of those in puberty (8.10), and of CDGP subjects (7.46) are not different statistically.

Discussion

The high diagnostic potential of PBR α , for HH, irrespective of the presence of deficiencies of other hypothalamic and/or pituitary hormones or age, allows its use for the differential diagnosis between CDGP, a transient benign condition, and HH. Early diagnosis of HH allows for etiologic investigation and proper treatment at an earlier age and the sure confirmation of CDGP, for the safe reassurance of boys and their families.

Key words

Delayed puberty; alpha subunit

RESUMO

Introdução

Em estudos recentes demonstramos que a $PBR\alpha$ (Razão Pico/Basal da subunidade alfa livre dos hormônios glicoprotéicos - $SUB\alpha$ - após GnRH) identifica o Hipogonadismo Hipogonadotrófico (HH), em indivíduos pré-puberes do sexo masculino, com elevada sensibilidade e especificidade.

Neste estudo avaliamos o desempenho da $PBR\alpha$ em homens normais de diferentes idades e estágios de desenvolvimento puberal em pacientes com HH combinado ou não com outras deficiências hormonais hipotalâmicas e/ou hipofisárias.

Pacientes e Métodos

Avaliou-se os níveis séricos da $SUB\alpha$ antes, 30 e 60 minutos após 100ug EV de GnRH em 84 meninos normais, 18 indivíduos com RCCDP, 13 pacientes com HH completo isolado (HHI), 21 com HH completo combinado (HHcC) e 10 pacientes com HH parcial combinado (HHpC), do sexo masculino.

Resultados

A mediana da $PBR\alpha$ dos indivíduos com RCCDP (7,46) é significativamente superior à mediana dos valores apresentados pelos pacientes com HHI (2,73), HHcC (1,58) e HHpC (2,41) ($p < 0,001$).

Valores da $PBR\alpha \leq 3,26$ estabelecem o diagnóstico diferencial entre o RCCDP e o HH com 93,2% de sensibilidade e 94,4% de especificidade.

As medianas dos valores da $PBR\alpha$ dos meninos normais pré-púberes entre 6 e 8 anos (7,20), entre 8 e 13 anos (8,71), dos em puberdade (8,10), e dos indivíduos com RCCDP (7,46) não diferem estatisticamente.

Discussão

O alto potencial diagnóstico da $PBR\alpha$ para o HH, independentemente da presença ou não de deficiência de outros hormonais hipotalâmicos e/ou hipofisários ou da idade, possibilita seu uso para o diagnóstico diferencial entre RCCDP, uma condição transitória e benigna, e HH. O diagnóstico precoce de HH permite a investigação etiológica e o tratamento adequado em indivíduos mais jovens, e, na certeza do diagnóstico de RCCDP, a tranquilização segura dos meninos e suas famílias.

Palavras chaves

Sububidade alfa livre; hipogonadismo hipogonadotrófico; atraso puberal

INTRODUÇÃO

O Retardo Constitucional do Crescimento e Desenvolvimento Puberal (RCCDP) - causa mais comum de atraso puberal em homens (55) - pode ser considerada um estado de hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) fisiológico transitório, muitas vezes, indistinguível do verdadeiro HH antes dos 18 anos.

A partir dessa constatação, temos a certeza de que a identificação de um marcador para este diagnóstico fisiopatológico será útil para orientar os médicos tanto na realização de outras investigações no caso de HH como para tranquilizar os pacientes e seus familiares no caso de RCCDP.

Em estudos anteriores, demonstramos que a resposta da subunidade alfa livre dos hormônios glicoprotéicos ($SUB\alpha$), após estímulo com GnRH, permite distinguir meninos pré-púberes de homens com HH completo (30) e que a $PBR\alpha$, razão entre o pico/basal da $SUB\alpha$, após GnRH, $\leq 3,26$ define o HH com 94,1 de especificidade e 94,7 de sensibilidade, obtendo-se 100% de sensibilidade com a $PBR\alpha \leq 4,81$ e 100% de especificidade quando a $PBR\alpha \leq 3,09$ (31).

Embora seja este um teste promissor para um diagnóstico fisiopatológico importante, existem dúvidas sobre seu desempenho em homens normais de diferentes idades e estágios de desenvolvimento puberal, importantes para a validação deste teste.

Nossos estudos prévios avaliaram homens com HH definitivo e completo, sendo que a forma parcial do HH, possivelmente mais difícil de diagnosticar,

também necessita ser avaliada, visto que os jovens que apresentam início mais tardio e a progressão mais lenta da puberdade podem ser portadores de HH parcial.

Outra importante definição a ser feita é sobre a interferência que o uso de T_4 pode causar na determinação da $PBR\alpha$, já que a $SUB\alpha$ é comum às gonadotrofinas e à tireotrofina e vários pacientes com HH (avaliados no estudo anterior) possuíam outras deficiências hormonais.

PACIENTES E MÉTODOS

Avaliou-se os níveis séricos da SUB α antes e após estímulo único com GnRH em 84 indivíduos normais, 18 indivíduos com RCCDP e 44 pacientes com HH, do sexo masculino. Tabela 1

O grupo de indivíduos normais foi composto por 34 meninos normais pré-púberes (avaliados entre 6 e 8 anos de idade, quando o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (H-H-G) encontra-se fisiologicamente suprimido); 25 meninos normais pré-púberes (avaliados entre 9 e 13 anos de idade, quando o eixo H-H-G é reativado), que tiveram início espontâneo e evolução normal da puberdade antes de 14 anos de idade; 25 meninos normais entre 11 e 17 anos de idade em estágios iniciais (II ou III, de Tanner) da puberdade, com volume testicular superior a 4 ml e inferior a 15 ml no momento do teste, acompanhados até completarem a puberdade. Nenhum tinha evidência de patologia orgânica que pudesse interferir no seu crescimento.

O grupo com RCCDP foi composto por 18 indivíduos pré-púberes, no momento do teste, nos quais a puberdade iniciou espontaneamente após completarem 14 anos de idade e evoluiu normalmente. Foram excluídos aqueles com história ou qualquer sinal de patologia orgânica que pudesse interferir no seu crescimento.

O grupo com HH foi composto por indivíduos que, após os 18 anos de idade, apresentavam volume testicular inferior a 4 ml ou não demonstraram progressão do

aumento inicial do volume do órgão por um período superior a 24 meses, com níveis séricos de gonadotrofinas e testosterona baixos.

Treze pacientes foram considerados portadores de HH isolado (HHI) por apresentarem volume testicular inferior a 4 ml em idade igual ou superior a 17 anos (deficiência exclusiva de gonadotrofinas) e que não evidenciaram aumento do volume testicular ou outros sinais de desenvolvimento puberal após os 18 anos de idade.

Vinte e um pacientes com idade superior a 18 anos, ausência de sinais físicos de puberdade, volume testicular inferior a 4 ml, deficiência de gonadotrofinas e de outros hormônios hipotalâmicos e/ou hipofisários foram considerados portadores de HH completo combinado com outras deficiências hormonais (HHcC).

Dez pacientes com idade superior a 18 anos, deficiência de gonadotrofinas e de outros hormônios hipotalâmicos e/ou hipofisários, que apresentaram início espontâneo, mas sem progressão da puberdade, mantendo o volume testicular inalterado por um período superior a 24 meses foram considerados portadores de HH parcial combinado com outras deficiências hormonais (HHpC).

Foram excluídos os indivíduos com síndromes genéticas, tumores cerebrais, cirurgia ou radioterapia craniana e usuários de anticonvulsivantes. Nenhum indivíduo testado fez uso de testosterona nos 5 meses que antecederam o teste.

A amostra de meninos normais e de indivíduos com RCCDP foi selecionada a partir dos pacientes que vinham para consulta de revisão clínica nos ambulatórios de pediatria e de medicina de adolescentes do HCPA. A amostra de pacientes com

deficiência de gonadotrofinas foi selecionada a partir dos pacientes que vinham para consulta no ambulatório de endocrinologia do HCPA.

O teste envolveu coletas sanguíneas antes (basal); 30 e 60 minutos após a injeção endovenosa de 100 μ g de GnRH (RELISORM® L, Serono; Barueri, SP). O soro foi congelado a -20°C e armazenado até a realização das dosagens. Os níveis da SUB α no soro foram dosadas em duplicata usando método imunofluorimétrico (48) com nível de detecção do ensaio = 4,0 ng/L, coeficiente de variação intra-ensaio < 5% e coeficiente de variação entre ensaio = 5%. Os padrões foram calibrados pelo 1º IRP, [78/569] (National Institute for Biological Standards and Control, Potter Bar, UK.)

Foram determinados para cada indivíduo os níveis séricos basal da SUB α (BASAL), o valor máximo atingido após o estímulo (PICO) e a PBR α , índice obtido pela divisão do valor do PICO pelo valor BASAL.

Foram estabelecidas as medianas e os limites do intervalo definidos pelos percentis 25 e 75 (P25-P75) de cada grupo. As comparações entre os resultados foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis. Foram calculadas as medidas de performance, i.e., especificidade e sensibilidade, na avaliação de cada um dos grupos utilizando-se o valor da PBR α \leq 3,26 definido como ponto de corte para o diagnóstico de HH no estudo anterior (31).

O intervalo de confiança foi determinado pela distribuição binomial. A análise e processamento dos dados foi feita com auxílio dos programas SPSS e MEDCALC®. O estudo foi aprovado pelo IRB do hospital. Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento informado.

TABELA 1 Características das amostras de meninos normais, indivíduos com Retardo Constitucional do Crescimento e desenvolvimento Puberal (RCCDP) e dos pacientes com Hipogonadismo Hipogonadotrófico (HH) subdivididas em grupo com características iguais.

| Grupos | | Número | Idade (anos) | Testículos (ml) | Usam T ₄ |
|---------------|--------------|--------|--------------|-----------------|---------------------|
| NORMAIS | pré-púberes | 34 | 6 – 8 | < 4 | Nenhum |
| | pré-púberes | 25 | 9 – 13 | < 4 | Nenhum |
| | em puberdade | 25 | 11 – 17 | 5 – 12 | Nenhum |
| RCCDP | RCCDP | 18 | 13 – 16 | < 4 | Nenhum |
| HIPOGONÁDICOS | HHI* | 13 | ≥ 17 | < 4 | Nenhum |
| | HHcC** | 21 | > 18 | < 4 | 19 |
| | HHpC*** | 10 | > 18 | 4 – 15 | 7 |

* HH completo Isolado

** HH completo Combinado com outras deficiências hormonais hipotalâmicas e/ou hipofisárias

*** HH parcial Combinado com outras deficiências hormonais hipotalâmicas e/ou hipofisárias

RESULTADOS

Os resultados das medianas e limites do intervalo (P25-P75) para os níveis séricos da SUB α Basal e Pico e os valores da PBR α de cada um dos grupos encontram-se na tabela 2.

A mediana dos valores da PBR α dos indivíduos com RCCDP é significativamente superior à mediana dos valores apresentados pelos pacientes com HH isolado (HHI) ($p < 0,001$). A sobreposição dos valores da PBR α entre RCCDP e HHI envolve resultados entre 4,81 e 3,12, que são inferiores ao P25 dos jovens com RCCDP e superiores ao P75 dos pacientes com HHI. Fig. 01

A mediana dos valores da PBR α dos indivíduos com RCCDP é significativamente superior à mediana dos apresentados pelos pacientes com HH parcial combinado com outras deficiências hormonais (HHpC) ($p < 0,001$). A sobreposição dos valores da PBR α entre RCCDP e HHpC envolve valores entre 3,26 e 3,12 que são próximos ao menor valor obtido nos indivíduo com RCCDP e ao maior valor obtido nos pacientes com HHpC. Fig. 01

A mediana dos valores da PBR α dos indivíduos com RCCDP é significativamente superior à mediana dos apresentados pelos pacientes com HH completo combinado com outras deficiências hormonais (HHcC) ($p < 0,001$). Não há sobreposição entre os valores dos dois grupos. Fig. 01

Valores da PBR $\alpha \leq 3,26$ estabelecem o diagnóstico de HH com 93,2% de sensibilidade na avaliação de todos os 44 pacientes com HH; 76,9% de

sensibilidade na avaliação do grupo de pacientes com HHI, e 100,0% de sensibilidade na avaliação tanto do grupo de pacientes com HHcC como do grupo de pacientes com HHpC. A especificidade foi de 94,4% considerando como normais o grupo de indivíduos com RCCDP.

Valores da $PBR\alpha \leq 4,81$ estabelecem o diagnóstico de HH em todos os grupos com HH com 100% de sensibilidade e 88,9% de especificidade; os da $PBR\alpha \leq 3,12$ estabelecem o diagnóstico de HH com 100% de especificidade e 76,9%, 100,0% e 80,0 de sensibilidade respectivamente na avaliação do grupo de pacientes com HHI, HHcC e HHpC.

A mediana dos valores da $PBR\alpha$ dos pacientes com HHI não difere da mediana dos pacientes com HHpC, enquanto ambas são significativamente maiores que a mediana dos valores encontrados nos pacientes com HHcC ($p < 0,001$). Fig. 01

A mediana dos valores basais da $SUB\alpha$ de meninos pré-púberes normais com idades entre 6 e 8 anos é significativamente menor do que de meninos normais pré-púberes com idades entre 9 e 13 anos ($p < 0,001$).

As medianas dos valores da $PBR\alpha$ dos meninos pré-púberes normais com idades entre 6 e 8 anos, dos meninos pré-púberes normais com idades entre 9 e 13 anos, dos meninos normais em puberdade e dos indivíduos com RCCDP são estatisticamente iguais. Fig. 02

TABELA 2 Medianas e limites do intervalo (P25-P75) dos níveis sérico Basais da subunidade alfa ($SUB\alpha$) e valores da $PBR\alpha$ para cada um dos grupos de meninos normais, indivíduos com RCCDP e pacientes com HH.

| Grupos | | $SUB\alpha$ Basal (ng/L) | $PBR\alpha$ |
|----------------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------|
| MENINOS NORMAIS | entre 6 a 8 anos | 58,5 (50,0-89,0) | 7,2 (6,2-9,1) |
| | entre 9 a 13 anos | 170,0 (95,0-197,0) | 8,7 (6,6-11,3) |
| | Em puberdade | 113,0 (72,0-177,0) | 8,1 (6,5-10,1) |
| RCCDP | RCCDP | 167,6 (99,0-243,0) | 7,5 (6,0-10,7) |
| HIPOGONÁDICOS | HHI* | 107,0 (77,0-115,0) | 2,7 (2,1-3,0) |
| | HHcC** | 80,0 (44,0-99,0) | 1,6 (1,3-1,9) |
| | HHpC*** | 135,0 (90,0-213,0) | 2,4 (2,1-3,1) |

* HH completo Isolado

** HH completo Combinado com outras deficiências hormonais hipotalâmicas e/ou hipofisárias

*** HH parcial Combinado com outras deficiências hormonais hipotalâmicas e/ou hipofisárias

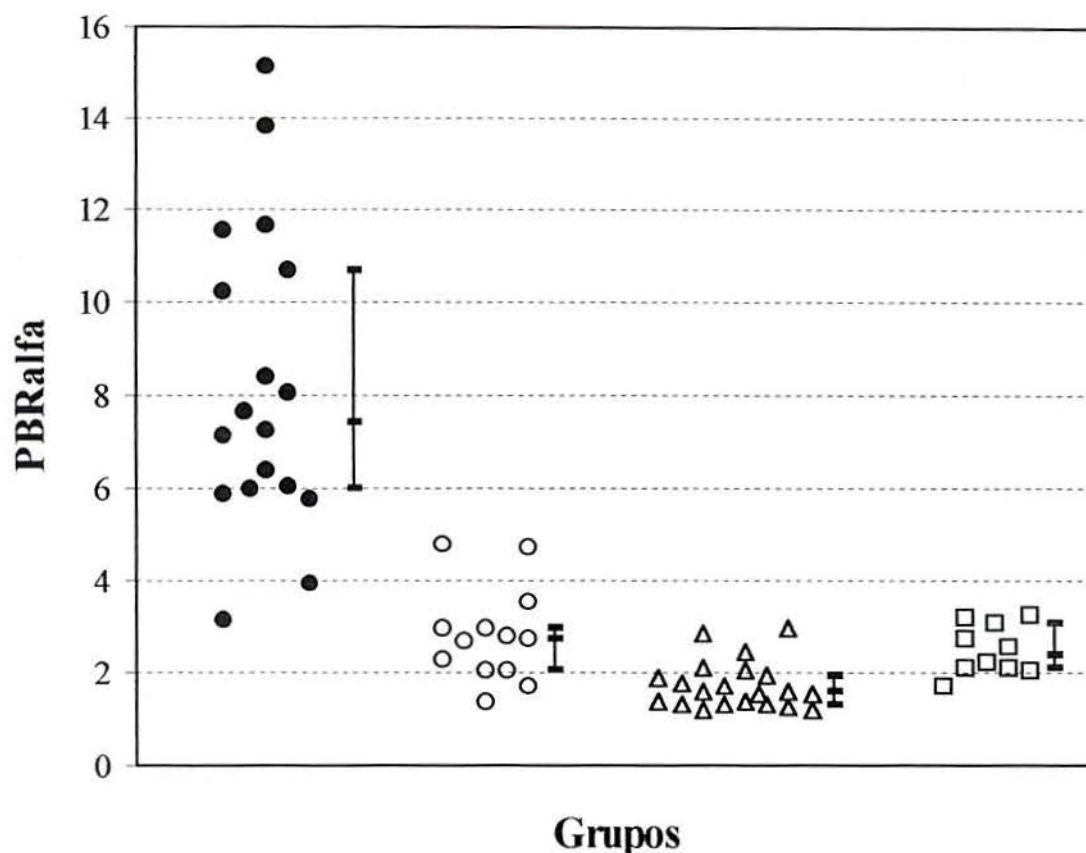


Fig. 01 – Valores da PBR_{α} de cada indivíduo avaliado nos grupos de pacientes com Hipogonadismo Hipogonadotrófico completo Isolado (○), pacientes com Hipogonadismo Hipogonadotrófico completo Combinado com outras deficiências hormonais hipotalâmicas e/ou hipofisárias (△), pacientes com Hipogonadismo Hipogonadotrófico parcial Combinado com outras deficiências hormonais hipotalâmicas e/ou hipofisárias (□) e indivíduos com Retardo Constitucional do Crescimento e Desenvolvimento Puberal (●). As linhas representam a mediana (traço central) e intervalos entre os percentis 25 (traço inferior) e 75 (traço superior) para cada um dos grupos.

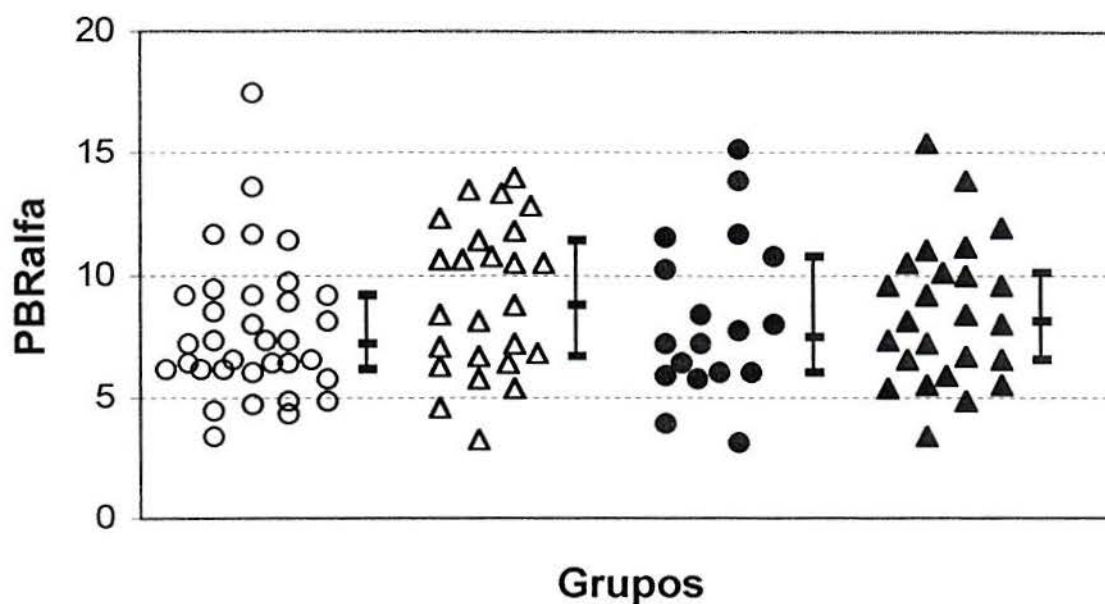


Fig. 02 – Valores da PBR_{α} de cada indivíduo avaliado nos grupos de meninos normais pré-púberes entre 6 e 8 anos de idade (O), meninos normais pré-púberes entre 9 e 13 anos (Δ), indivíduos com Retardo Constitucional do Crescimento e Desenvolvimento Puberal (●) e meninos normais em puberdade (\blacktriangle). As linhas representam as medianas (traço central) e intervalos entre os percentis 25 (traço inferior) e 75 (traço superior) para cada um dos grupos.

DISCUSSÃO

Em estudos anteriores, demonstramos o potencial da $SUB\alpha$ e do índice denominado $PBR\alpha$ de diferenciar meninos normais de adultos portadores de HH (30, 31). No primeiro, avaliamos meninos com idades entre 6 e 8 anos, época em que o eixo H-H-G encontra-se fisiologicamente suprimido (30); no segundo, indivíduos pré-púberes com idades entre 8 e 16 anos, época em que o eixo H-H-G inicia sua reativação (31).

Determinamos que valores da $PBR\alpha$ (razão Pico/Basal da $SUB\alpha$) iguais ou inferiores a 3,26 definem o HH com elevada sensibilidade e especificidade. No entanto, nenhum dos estudos avaliou o comportamento da $SUB\alpha$ em meninos com RCCDP e se a $PBR\alpha$ será tão eficaz no diagnóstico de pacientes com HH isolado ou com HH parcial.

O presente estudo comprovou que em indivíduos pré-púberes com RCCDP, os valores da $PBR\alpha$ são superiores aos de pacientes com HH. A diferença entre eles é significativa, havendo sobreposição dos resultados apenas no intervalo entre os valores da $PBR\alpha \leq 4,81$ e $\geq 3,12$, inferiores ao P25 dos indivíduos com RCCDP e superiores ao P75 de todos os pacientes testados com HH (Fig. 01).

O fato da sobreposição dos resultados ocorrer num intervalo restrito, inferior ao P25 dos normais e superior ao P75 dos doentes, confere ao teste grande relevância e aplicabilidade clínica. Pode-se afirmar que todos os indivíduos com HH terão valores de $PBR\alpha$ inferiores a 4,81 (100% de sensibilidade e 88,9% de

especificidade) e que nenhum indivíduo com RCCDP apresentará valores inferiores a 3,12 (100% de especificidade e 88,6% sensibilidade).

O valor da $PBR\alpha \leq 3,26$, estabelecido como ponto de corte no estudo anterior, diagnostica o HH com 93,2% de sensibilidade e 94,4% de especificidade. Estes resultados são muito semelhantes aos obtidos no estudo anterior, que avaliou meninos normais com idades entre 8 e 16 anos (31). O elevado poder da $PBR\alpha$ em distinguir RCCDP do HH demonstrado neste estudo confirmam os resultados anteriores que apontam a $PBR\alpha$ como um índice potente para o diagnóstico diferencial do atraso puberal (30, 31).

Na avaliação dos pacientes com HH, separando-os conforme a presença ou não de outras deficiências hormonais (HH combinado ou isolado) ou pela presença ou não de aumento inicial do volume testicular, (HH parcial ou completo), observam-se diferenças nos valores da sensibilidade quando se utiliza o mesmo ponto e corte. Valores da $PBR\alpha \leq 3,26$ diagnosticam o HH entre pacientes com HH isolado (HHI) com 76,9% de sensibilidade.

Avaliando-se apenas os pacientes com HH completo combinado com outras deficiências hormonais hipotalâmicas e/ou hipofisárias (HHcC) ou apenas os pacientes com HH parcial combinado com outras deficiências hormonais hipotalâmicas e/ou hipofisárias (HHpC), o teste apresenta 100% de sensibilidade.

A $SUB\alpha$ é comum às gonadotrofinas hipofisárias assim como ao TSH (40) e é produzida tanto nos gonadotrofos como nos tireotrofos (52, 54). A amostra avaliada neste e nos dois estudos anteriores, composta de pacientes com HH isolado e pacientes com HH combinado com outras deficiências hormonais hipotalâmicas e/ou

hipofisárias, inclusive de TSH, poderia causar algum viés nos resultados, já que a deficiência de TSH ou o uso de T_4 interfeririam na secreção de $SUB\alpha$ oriunda do tireotrófo.

Já foi relatado que os níveis séricos de $SUB\alpha$ em pacientes com deficiência exclusiva de gonadotrofinas não se alteravam após a supressão do TSH pelo T_4 (54) e que a resposta ao teste de estímulo com hormônio liberador da tireotrofina (TRH) provoca incremento igual nos níveis de $SUB\alpha$ em pacientes com HH e homens normais (52).

No presente estudo, os valores da $PBR\alpha$ dos pacientes com HH isolado que possuíam secreção adequada de TSH e de outros hormônios hipofisários e não usavam T_4 , são significativamente superiores aos dos pacientes com HHcC. Tal situação poderá ter ocorrido devido ao maior comprometimento funcional e/ou estrutural da hipófise, expresso pela deficiência de vários hormônios e não resultar apenas da supressão do tireotrófo pelo uso do T_4 .

Mesmo assim, esta diferença não compromete o potencial da $PBR\alpha$ em diferenciar o RCCDP de HHI, já que indivíduos com RCCDP possuem valores da $PBR\alpha$ significativamente maiores que os apresentados por pacientes com HHI, havendo sobreposição dos resultados dentro do mesmo intervalo de valores apresentado anteriormente (4,81 – 3,12).

A grande relevância e aplicabilidade clínica mantém-se. Pode-se afirmar com 100% de sensibilidade e 88,9% de especificidade que a resposta de indivíduos com HHI ao teste será inferior a 4,81 e com 100% de especificidade e 76,92%

sensibilidade que nenhum indivíduo com RCCDP apresentará respostas inferiores a 3,12.

Como ocorre com outras variáveis biológicas é inevitável a existência de um intervalo de valores em que persistirá a dúvida diagnóstica. A expressiva contribuição obtida com a análise da $PBR\alpha$ está no fato deste intervalo de sobreposição ser restrito e distante do intervalo entre os percentis 25 e 75 dos tanto de indivíduos normais como dos com HH.

O alto potencial diagnóstico da $PBR\alpha$ (independente de haver ou não outras deficiências hormonais hipofisárias) pode ser explicado pelo fato do gonadotrofo ser o principal local de síntese da $SUB\alpha$ (52, 54) e o GnRH exercer marcada influência em sua secreção (44, 51). No presente estudo, o estímulo para liberação da $SUB\alpha$ foi feito com GnRH.

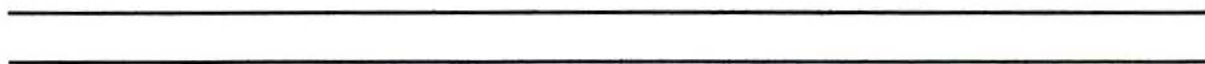
O estudo não permite concluir sobre o potencial diagnóstico da $PBR\alpha$ nos casos de HH parcial isolado. Assim como os pacientes com HHI apresentam valores da $PBR\alpha$ significativamente superiores aos com HHcC, é possível que a resposta dos pacientes com HH parcial isolado seja diferente dos com HHpC.

A relação entre a secreção do LH, do FSH e da $SUB\alpha$ foi demonstrada em vários estudos (42, 44, 45, 51, 53, 54). Os níveis séricos da $SUB\alpha$ são baixos na infância aumentam da puberdade para a vida adulta (45). No estudo atual, demonstrou-se que a mediana da $SUB\alpha$ basal dos meninos pré-púberes normais com idade entre 9 e 13 anos é maior que a observada nos meninos menores com idade entre 6 e 8 anos.

Os valores basais da $SUB\alpha$, no entanto, não diferenciam meninos normais de pacientes com HH (30). Demonstrou-se, neste estudo, que os valores da $PBR\alpha$ nos meninos pré-púberes normais de diferentes idades, meninos normais em puberdade e nos indivíduos com RCCDP não diferem estatisticamente e não aumentando com a idade.

O alto poder em diagnosticar o HH demonstrado pela $PBR\alpha$ (neste e nos dois estudos anteriores) e o fato de não ser influenciada pela idade, possibilita seu uso para o diagnóstico diferencial entre RCCDP e HH. Estabelecer o diagnóstico mais precocemente permite a realização de investigações etiológicas pertinentes e estabelecimento de condutas terapêuticas mais cedo e de forma mais segura .

CONSIDERAÇÕES FINAIS



CONSIDERAÇÕES FINAIS

A motivação para os nossos estudos está baseada na necessidade enfrentada na prática clínica de determinar, antes dos 18 anos, se um paciente com atraso puberal possui Hipogonadismo Hipogonadotrófico (HH) ou Retardo Constitucional do Crescimento e Desenvolvimento Puberal (RCCDP).

O primeiro estudo realizado, apresentado na dissertação de mestrado, abre um novo e inexplorado caminho em direção da solução desta dificuldade ao demonstrar que a avaliação dos níveis sérico subunidade alfa livre dos hormônios glicoprotéicos ($\text{SUB}\alpha$), antes e após estímulo com hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) permite distinguir meninos normais de homens adultos portadores de HH.

O segundo estudo, aqui apresentado como artigo 1, solidifica estes achados e define a $\text{PBR}\alpha$ como um marcador capaz de diagnosticar o HH com elevada sensibilidade e especificidade.

O último estudo, aqui apresentado como artigo 2, vai em busca do esclarecimento de alguns pontos importantes e demonstra que este marcador possibilita diferenciar o RCCDP do HH seja ele completo isolado (HHI), completo

combinado com outras deficiências de hormônios hipotalâmicos e/ou hipofisários (HHcC) ou parciais combinados (HHpC).

Também demonstramos que, em indivíduos normais, a $PBR\alpha$ não se altera com a idade ou com o nível de funcionamento do eixo H-H-G permitindo a sua utilização em pacientes cuja puberdade demorará para iniciar.

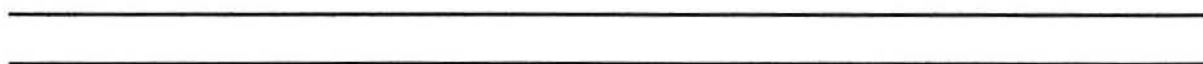
Muitas dúvidas ainda necessitam ser esclarecidas. Na prática clínica encontramos indivíduos, sem sinais de alguma deficiência hormonal, que iniciam normal ou tardiamente sua puberdade e esta evolui de forma lenta. Por vezes observamos homens que atingem um desenvolvimento adequado, mas mantêm níveis séricos de testosterona limítrofes, apresentando baixa libido, dificuldades para obter ou manter a ereção além de perturbações da fertilidade. Estes casos poderiam ser uma expressão de HH parcial isolado (HHpl). Como os estudos anteriores não permitem estabelecer conclusões sobre a liberação da $SUB\alpha$ em pacientes com HHpl, será válido definir como será a resposta do teste nestes indivíduos.

As crianças com déficit do hormônio do crescimento (GH) podem ou não possuir deficiência de gonadotrofinas. Como são crianças com idade óssea atrasada e podem ter atraso puberal, surge a dúvida sobre quais também apresentam HH. Nosso estudo não avaliou meninos deficientes de GH com e sem HH. Esta informação é importante para que o teste possa ser usado em todos os pacientes com nanismo hipofisário.

Mesmo frente a estes resultados e conclusões que apontam para a solução da dificuldade no diagnóstico diferencial entre RCCDP e HH, a solidificação destes achados mereceria estudos com amostragens mais amplas que possibilitassem

definir mais precisamente os valores da $PBR\alpha$ que serão utilizados como ponto de corte no teste. Assim como esclarecer os pontos de dúvida acima citados.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



REVISÃO BIBLIOGRAFICA

- 1 - BARCENA, D.G.; KASTIN, A. J. SCHALCH, D.S. et alii. Synthetic LH-Releasing Hormone (LH-RH) administered to normal men by different routes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 37 (3):481-484, 1973.
- 2 - BELCHETZ, P. E.; PLANT, T.M.; NAKAI, Y. et alii. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. **Science**, 202: 631-633, 1978.
- 3 - BRADLEY, G.W. **Disease Diagnosis e Decisions**. John Wiley & Sons; 1993.
- 4 - CHIPKEVITCH, E. Variações neuro-hormonais. In: CHIPKEVITCH, E. **Puberdade & Adolescência** : aspectos biológicos, clínicos e psicossociais. São Paulo: Roca, p. 85-99, 1994.
- 5 - CHIPKEVITCH, E. Maturação sexual e óssea. In: CHIPKEVITCH, E. **Puberdade & Adolescência** : aspectos biológicos, clínicos e psicossociais. São Paulo: Roca, p.53-85, 1994.

- 6 - COLLI, A.S. Crescimento e desenvolvimento físico do adolescente. In: MAAKAROUN, M.F.; SOUZA, R.P.; CRUZ, A.R. ed. **Tratado de adolescência: um estudo multidisciplinar.** 1.ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p.243-257, 1991.
- 7 - COLLI, A. Maturação sexual. In: SETIAN, N. ed. **Endocrinologia pediátrica: aspectos físicos e metabólicos do recém-nascido ao adolescente.** São Paulo: Sarvier, p.36-44, 1989.
- 8 - COLLI, A.S.; BERQUÓ, E.; MARQUES, R.M. **Crescimento e Desenvolvimento Pubertário em Crianças e Adolescentes Brasileiros IV - Volume Testicular.** São Paulo: Editora Brasileira de Ciência, p. 67, 1984.
- 9 - CROWLEY, W.F.; FILICORI, M.; SPRATT, D.I. et alii. The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. **Recent progress in hormone research**, 41:473-526, 1985.
- 10 - CROWLEY, W.F.; WHITCOMB, R.W. Gonadotropin-releasing hormone deficiency in men: diagnosis and treatment with exogenous gonadotropin-releasing hormone. **Am J Obstet Gynecol.**, 163:1752-1758, 1990.
- 11 - EHRMANN, D.A.; ROSENFELD, R.L.; CUTTLER, L. et alii. A new test of combined pituitary-testicular function using the gonadotropin-releasing hormone agonist nafarelin in the differentiation of gonadotropin deficiency from delayed puberty: pilot studies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 69 (5):963-967, 1989.
- 12 - EISENSTEIN, E. Puberdade e processo de controle neuroendócrino. In: MAAKAROUN, M.F.; SOUZA, R.P.; CRUZ, A.R. ed. **Tratado de adolescência:**

- um estudo multidisciplinar. 1.ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p.258-269, 1991.
- 13 - GARNIER, P.E.; CHAUSSAIN, J.L.; BINET, E. et alii. Effect of synthetic luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) on the release of gonadotrophins in children and adolescents. VI. relations to age, sex and puberty., **Acta Endocr.**, 77:422-434, 1974.
- 14 - GHAI, K.; CARA, J.F.; ROSENFELD, R.L. Gonadotropin releasing hormone agonist (Nafarelin) test to differentiate gonadotropin deficiency from constitutionally delayed puberty in teen-age boys - a clinical research center study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 80 (10):2980-2986, 1995.
- 15 - GOJI, K.; TANIKAZE, S. Comparison between spontaneous gonadotropin concentration profiles and gonadotropin response to low-dose gonadotropin-releasing hormone in prepubertal and early pubertal boys and patients with hypogonadotropic hypogonadism: assessment by using ultrasensitive, time-resolved immunofluorometric assay. **Pediatr. Res.**, 31 (5):535-539, 1992.
- 16 - GRUMBACH, M.M.; STYNE, D.M. Puberty: ontogeny, neuroendocrinology, physiology and disorders. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. ed. **Williams textbook of endocrinology**. 8.ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1992. p.1139-1222.
- 17 - HAAVISTO, A.M.; DUNKEL, L.; PETTERSSON, K. et alii. LH measurements by in vitro bioassay and a highly sensitive immunofluorometric assay improve the distinction between boys with constitutional delay of puberty and hypogonadotropic hypogonadism. **Pediatr. Res.**, 27(3):211-214, 1990.

- 18 - HAISENLEDER, D.J.; DALKIN, A.C.; ORTOLANO, G.A. et alii. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes:evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. **Endocrinology**, 128 (1):509-517, 1991.
- 19 - JAKACKI,R.I.; KELCH,R.P.; SAUDER,S.E. et alii. Pulsatile secretion of luteinizing hormone in children. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 55 (3):453-458, 1982.
- 20 - JOB,J.C.; CHAUSSAIN,J.L.; GARNIER,P.E. The use of luteinizing hormone-releasing hormone in pediatric patients. **Hormone res.**, 8 (3):171-187, 1977.
- 21 - JOHANSON, A. Fluctuations of gonadotropin levels in children. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 39 (1):154-159, 1974.
- 22 - KAPLAN, S.L.; GRUMBACH, M.M.; AUBERT, M.L. α and β glycoprotein hormone subunits (hLH, hFSH, hCG) in the serum and pituitary of the human fetus. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 42 (5):995-998, 1976.
- 23 - KLETTER,G.B.; KELCH,R.P. Disorders of puberty in boys. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, 22 (3):455-477, 1993.
- 24 - KOURIDES, I. A.; LANDON, M. B.; HOFFMAN, B. J. et alii. Excess free alpha relative to beta subunits of the glycoprotein hormones in normal and abnormal human pituitary glands. **Clin. Endocrinol.**, 12:407 - 416, 1980.
- 25 - KULIN, H.E. Delay puberty **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 81 (10):3460-3464, 1996.

- 26 - LANES, R.; PALACIOS, A.; AVENDANO, E. et alii. The metoclopramide test: a useful tool with the luteinizing hormone-releasing hormone test in distinguishing between constitutional delay of puberty and hypogonadotropic hypogonadism. **Fertil. Steril.**, 52 (1):55-59, 1989.
- 27 - LAHLOU, N.; ROGER, M.; CHAUSSAIN, J.L. et alii. Gonadotropin and α -subunit secretion during long term pituitary suppression by D-Trp-luteinizing hormone-releasing hormone microcapsules as treatment of precocious puberty. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 65 (5):946-953, 1987.
- 28 - LEMAY, A.; LOURDUSAMY, M. Gonadotrophin releasing hormone agonist suppressive treatment of ovarian function decreases serum LH- α and bioactive LH but maintains elevated levels of LH- α . **Clin. Endocrinol.**, 34:191-196, 1991.
- 29 - LINDNER, J.; RIVIER, J. E.; VALE, W.W. et alii. Regulation of pituitary glycoprotein α -subunit secretion after administration of a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist in normal men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 70 (4):1219-1224, 1990.
- 30 - MAINIERI, A.S., ELNECAVE, R.H. Response of free alfa-subunit to GnRH distinguishes individuals with "functional" from those with permanent hypogonadotropic hypogonadism. **Horm.res**, 50:212-216, 1998.
- 31 - MAINIERI, A.S., ELNECAVE, R.H. Hypogonadotropic Hipogonadism is diagnosed by the Peak/Basal Ration of free α subunit (PBR α). Enviado para publicação. Ver original em anexo.

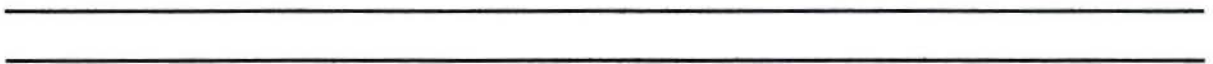
- 32 - NICHOLSON, A.B.; HANLEY C. Indices of physiological maturity: derivation and interrelationships. **Child Development**, 24:3-38, 1953.
- 33 - PAPAVALIIOU, S.S.; ZMEILI, S.; KHOURY, S. et alii. Gonadotropin-releasing hormone differentially regulates expression of the genes for luteinizing hormone alpha and beta subunits in male rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 83 (11):4026-4029, 1986.
- 34 - PARKER, D.C.; JUDD, H.L.; ROSSMAN, L.G. et alii. Pubertal sleep-wake patterns of episodic LH, FSH and testosterone release in twin boys. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 40 (6):1099-1109, 1975.
- 35 - PARTSCH, C.J.; HERMANUSSEN, M.; SIPPELL, W.G. Differentiation of male hypogonadotropic hypogonadism and constitutional delay of puberty by pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 60 (6):1196-1203, 1985.
- 36 - PIERCE, J.G.; PARSONS, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Annu Rev. Biochem.**, 50:465 - 472, 1981.
- 37 - PLYMATE, S. Hypogonadism. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, 23 (4):749-722, 1994.
- 38 - PRENTICE, L.G.; RYAN, R.J. LH and its subunits in human pituitary, serum and urine. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 40 (2):303 - 312, 1975.
- 39 - RADZAN, A.K.; FANG, V.S.; RICH, B.H. et alii. Gonadotropin-releasing hormone infusion test in the distinction of hypopituitary patients from normal subjects. **Fertil. Steril.**, 31 (5):507-512, 1979.

- 40 - REICHLIN, S. Neuroendocrinology. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. ed. **Williams textbook of endocrinology**. 8.ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, p.135-220, 1992.
- 41 - ROSENFELD, R.L. Diagnosis and management of delayed puberty. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 70 (3):559-562, 1990.
- 42 - SAMUELS, M.H.; VELDHUIS, J.D.; HENRY, P. et alii. Pathophysiology of pulsatile and copulsatile release of thyroid-stimulating hormone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and α -subunit. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 71 (2):425-432, 1990.
- 43 - SMALS, A.G.H.; HERMUS, A.R.M.; BOERS, G.H.J. et alii. Predictive value of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) bolus testing before and after 36-hour pulsatile LHRH administration in the differential diagnosis of constitutional delay of puberty and male hypogonadotropic hypogonadism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 78 (3):602-608, 1994.
- 44 - SPRATT, D.I.; CHIN, W.W.; RIDGWAY, E.C. et alii. Administration of low dose pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) to GnRH-deficient men regulates free α -subunit secretion. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 62 (1):102-108, 1986.
- 45 - STYNE, D.M.; KAPLAN, S.L.; GRUMBACH, M.M. Plasma glycoprotein hormone α -subunit in the neonate and in prepubertal and pubertal children: effects of luteinizing hormone-releasing hormone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 50 (3):450-455, 1980.

- 46 - STYNE, D.M. Puberty and its disorders in boys. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, 20 (1):43-69, 1991.
- 47 - VALK, T.W.; CORLEY, K.P.; KELCH, R.P. et alii. Hypogonadotropic hypogonadism: hormonal responses to low dose pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 51 (4):730-738, 1980.
- 48 - VIEIRA, J.G.H.; NISHIDA, S.K.; LOMBARDI, M.T. et alii. Monoclonal antibodies specific for the free alpha subunit of glycoprotein hormones and their use in the development of a sensitive immunofluorometric assay. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 28 (6):633-636, 1995.
- 49- WEINSTEIN, R.L.; REITZ, R.E. Pituitary-testicular responsiveness in male hypogonadotropic hypogonadism. **J. Clin. Investigation**, 53:408-415, 1974.
- 50 - WHITCOMB, R.W.; CROWLEY JR. W.F. Male hypogonadotropic hypogonadism. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, 22 (1):125-144, 1993.
- 51 - WHITCOMB, R.W.; O'DEA, L.S.; FINKELSTEIN, J.S. et alii - Utility of Free Alpha-subunit as an Alternative Neuroendocrine Marker of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Stimulation of The Gonadotropin in the Human: Evidence from Normal and GnRH-Deficient Men. **J-Clin-Endocrinol-Metab**, 70 (6):1654-61, 1990.
- 52 - WINTERS, S.J.; TROEN, P. Pituitary glycoprotein hormone α -subunit secretion after thyrotropin-releasing hormone stimulation in normal men and men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 70 (2):544-547, 1990.

- 53 - WINTERS, S.J.; TROEN, P. Pulsatile secretion of immunoreactive α -subunit in man. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 60 (2):344-348, 1985.
- 54 - WINTERS, S.J.; TROEN, P. α -subunit secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 66 (2):338-342, 1988.
- 55 - WOOD, D.F.; FRANKS, S. Delayed puberty. **Br. J. Hospital Med.**, 41:223-230, 1989.
- 56 - WU, F.C.W.; BORROW, S.M.; NICOL, K. et alii. Ontogeny of pulsatile gonadotrophin secretion and pituitary responsiveness in male puberty in man: a mixed longitudinal and cross-sectional study. **J. Endocrinol.**, 123:347-359, 1989.
- 57 - WU, F.C.W.; BUTLER, G.E.; KELNAR, C.J.H. et alii. Patterns of pulsatile luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in prepubertal (midchildhood) boys and girls and patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann's syndrome): a study using an ultrasensitive time-resolved immunofluorometric assay. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 72 (6):1229-1237, 1991.
- 58 - WYNGAARDEN, J.B.; SMITH, I.H.Jr. **Tratado de medicina interna - Cecil.** 18.ed. Rio de Janeiro Guanabara Kogan S.A., 1990.

ANEXO I



TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÕES

Normais

São diversos os problemas de saúde apresentados pelas crianças, e todos eles exigiram muitos estudos e pesquisas para serem entendidos e resolvidos pelos médicos.

Estamos pesquisando uma forma de detectar, o mais cedo possível, quais as crianças que, por serem portadoras de uma determinada alteração hormonal, atingirão a idade adulta sem desenvolver seu aparelho reprodutor (seios, pêlos, pênis, útero, etc.) e, devido a isto, incapacitadas de ter relações sexuais ou mesmo ter filhos. A descoberta destes casos precocemente, favorece um melhor e mais adequado tratamento possibilitando a resolução do problema.

Para desenvolvermos nosso estudo necessitaremos avaliar o comportamento hormonal de varios rapazes normais, saudáveis como o seu filho. O estudo consiste na aplicação de uma pequena dose do hormônio responsável pelo desencadeamento da puberdade e, da coleta subsequente de 3 (três) amostras de sangue com intervalos de 30 (trinta) minutos entre cada uma delas. Este hormônio já foi amplamente testado e é largamente usado neste tipo de teste, sendo aprovado mundialmente para este fim. A dose que nós usaremos é a habitual e não apresentam qualquer risco para a saúde, nem mesmo estão relatados efeitos colaterais. Para as coletas de sangue colocaremos um *BUTTERFLY* (pequena agulha) no dorso da mão do rapaz, por onde aplicaremos o hormônio e também faremos as três coletas de sangue. Desta forma o jovem sentirá apenas uma picada da agulha semelhante a qualquer exame de sangue rotineiro. O risco desta coleta é extremamente pequeno e igual a qualquer outra coleta de sangue feita rotineiramente. Usaremos seringas e agulhas descartáveis em todas as coletas de sangue.

Será retirado de cada jovem um máximo de 15ml de sangue que corresponde a aproximadamente 0,5% do total de sangue existente no corpo. Desta forma não há risco desta coleta causar anemias ou distúrbios de saúde. O teste terá uma duração de uma hora, porém nos intervalos das três coletas o jovem poderá se movimentar sem problemas.

Considerando o fato do seu filho ser uma jovem normal, gostaríamos de aproveitar este momento e contar com a sua colaboração e a do seu filho para

realizarmos nele o teste acima citado. Para nós, sua colaboração será de enorme valia e viabilizará nossa pesquisa que, por fim, ajudará no diagnóstico de problemas em muitas outras crianças. Os senhores serão informados dos resultados dos testes.

Caso concorde em colaborar com nossos estudos, solicitamos que assine o termo abaixo para que conste do nosso projeto.

Eu,....., fui informado(a) dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual meu filho estará envolvido, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento, bem como poderei retirar meu consentimento de participar na pesquisa caso volte atrás em minha decisão.

Fui informado(a) que caso existam danos à saúde de meu filho, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Foi-me garantido que todas as informações fornecidas aos pesquisadores, bem como todos os resultados de exames referentes ao meu filho serão mantidos sob sigilo só sendo utilizados no âmbito científico da pesquisa.

assinatura do responsável pelo paciente

assinatura do investigador

assinatura do orientador

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÕES

Pacientes

São diversos os problemas de saúde apresentados pelas crianças, e todos eles exigiram muitos estudos e pesquisas para serem entendidos e resolvidos pelos médicos.

Estamos pesquisando uma forma de detectar, o mais cedo possível, quais as crianças que, por serem portadoras de uma determinada alteração hormonal, atingirão a idade adulta sem desenvolver seu aparelho reprodutor (seios, pêlos, pênis, útero, etc.) e, devido a isto, incapacitadas de ter relações sexuais ou mesmo ter filhos. A descoberta destes casos precocemente, favorece um melhor e mais adequado tratamento possibilitando a resolução do problema.

Para desenvolvermos nosso estudo necessitaremos avaliar o comportamento hormonal de varias crianças normais e de várias pessoas portadoras de deficiência hormonal como você. O estudo consiste na aplicação de uma pequena dose do hormônio responsável pelo desencadeamento da puberdade e, da coleta subsequente de 3 (três) amostras de sangue com intervalos de 30 (trinta) minutos entre cada uma delas. Este hormônio já foi amplamente testado e é largamente usado neste tipo de teste, sendo aprovado mundialmente para este fim. A dose que nós usaremos é a habitual e não apresenta qualquer risco para a saúde, nem mesmo estão relatados efeitos colaterais. Sem dúvida você já realizou este teste em outra oportunidade, já estando familiarizado com ele. Para as coletas de sangue colocaremos um *BUTTERFLY* (pequena agulha) no antebraço, por onde aplicaremos o hormônio e também faremos as três coletas de sangue. Desta forma só será sentida uma picada da agulha semelhante a qualquer exame de sangue rotineiro. O risco desta coleta é extremamente pequeno e igual a qualquer outra coleta de sangue feita rotineiramente. Usaremos seringas e agulhas descartáveis em todas as coletas de sangue.

Será retirado de cada paciente um máximo de 30ml de sangue que corresponde a aproximadamente 0,5% do total de sangue existente no corpo. Desta forma não há risco desta coleta causar anemias ou distúrbios de saúde. O teste terá uma duração de uma hora.

Tendo isto posto gostaríamos solicitar a sua colaboração nesta importante pesquisa concordando em realizar o teste acima citado. Para nós, sua

colaboração será de enorme valia e viabilizará nossa pesquisa que por fim ajudará no diagnóstico de problemas em muitas crianças. O senhor será informado dos resultados dos testes.

Caso concorde em colaborar com nossos estudos, solicitamos que assine o termo abaixo para que conste do nosso projeto.

Eu,....., fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento, bem como poderei retirar meu consentimento de participar na pesquisa caso volte atrás em minha decisão.

Fui informado que caso existam danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

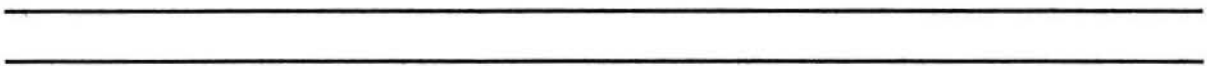
Foi-me garantido que todas as informações por mim fornecidas aos pesquisadores, bem como todos os meus resultados de exames serão mantidos sob sigilo só sendo utilizados no âmbito científico da pesquisa.

assinatura do paciente

assinatura do investigador

assinatura do orientador

ANEXO II



CARACTERÍSTICAS DO MENINOS PRÉ-PÚBERES NORMAIS COM IDADE ENTRE 6 E 8 ANOS

| Nº | Artigo | DROGAS | IDADE | TESTÍCULOS |
|-----|---------|---------|-------|------------|
| | | Em uso | meses | |
| 222 | 1º e 2º | não usa | 96 | 3 |
| 231 | 1º e 2º | não usa | 108 | 2 |
| 238 | 1º e 2º | não usa | 104 | 2 |
| 245 | 2º | não usa | 108 | 2 |
| 244 | 2º | não usa | 83 | 2 |
| 260 | 2º | não usa | 99 | 2 |
| 125 | 2º | não usa | 112 | 2 |
| 259 | 2º | não usa | 86 | 2 |
| 258 | 2º | não usa | 85 | 2 |
| 243 | 2º | não usa | 95 | 2 |
| 256 | 2º | não usa | 93 | 2 |
| 255 | 2º | não usa | 89 | 3 |
| 254 | 2º | não usa | 77 | 1 |
| 252 | 2º | não usa | 93 | 2 |
| 251 | 2º | não usa | 74 | 2 |
| 249 | 2º | não usa | 98 | 2 |
| 247 | 2º | não usa | 75 | 2 |
| 257 | 2º | não usa | 82 | 2 |
| 236 | 2º | não usa | 80 | 2 |
| 32 | 2º | não usa | 108 | 2 |
| 230 | 2º | não usa | 109 | 3 |
| 246 | 2º | não usa | 85 | 2 |
| 227 | 2º | não usa | 91 | 2 |
| 232 | 2º | não usa | 81 | 2 |
| 212 | 2º | não usa | 99 | 2 |
| 221 | 2º | não usa | 101 | 2 |
| 242 | 2º | não usa | 79 | 3 |
| 219 | 2º | não usa | 86 | 2 |
| 218 | 2 | não usa | 84 | 3 |
| 215 | 2 | não usa | 83 | 2 |
| 213 | 2 | não usa | 88 | 1 |
| 211 | 2 | não usa | 108 | 2 |
| 241 | 2 | não usa | 90 | 2 |
| 234 | 2 | não usa | 76 | 2 |

CARACTERÍSTICAS DOS MENINOS PRÉ-PÚBERES NORMAIS COM IDADE ENTRE 9 E 13 ANOS

| Nº | Artigo | DROGAS Em uso | IDADE meses | TESTÍCULOS em ml |
|-----|---------|------------------|----------------|---------------------|
| 4 | 1º e 2º | não usa | 157 | 4 |
| 6 | 2º | não usa | 158 | 2 |
| 13 | 2 | não usa | 124 | 2 |
| 20 | 1º e 2º | não usa | 155 | 2 |
| 21 | 2º | não usa | 154 | 2 |
| 24 | 1º e 2º | não usa | 144 | 2 |
| 34 | 1º e 2º | não usa | 125 | 2 |
| 40 | 1º e 2º | não usa | 148 | 3 |
| 55 | 2 | não usa | 137 | 2 |
| 57 | 2 | não usa | 147 | 3 |
| 58 | 2 | não usa | 135 | 3 |
| 64 | 2º | não usa | 131 | 3 |
| 66 | 1º e 2º | não usa | 149 | 3 |
| 67 | 2 | não usa | 125 | 2 |
| 69 | 1º e 2º | não usa | 144 | 3 |
| 70 | 1º e 2º | não usa | 146 | 3 |
| 73 | 2º | não usa | 145 | 3 |
| 78 | 1º e 2º | não usa | 156 | 3 |
| 79 | 2 | não usa | 144 | 2 |
| 82 | 2 | não usa | 146 | 2 |
| 95 | 2 | não usa | 151 | 2 |
| 107 | 2 | não usa | 126 | 2 |
| 113 | 2 | não usa | 157 | 3 |
| 115 | 2 | não usa | 120 | 2 |
| 248 | 1º e 2º | não usa | 122 | 3 |

CARACTERÍSTICAS DO MENINOS NORMAIS EM PUBERDADE

| Nº | Artigo | DROGAS | IDADE | TESTÍCULOS |
|-----|--------|---------|-------|------------|
| | | Em uso | meses | Em ml |
| 1 | 2º | não usa | 169 | 8 |
| 11 | 2º | não usa | 203 | 6 |
| 17 | 2º | não usa | 205 | 6 |
| 22 | 2º | não usa | 151 | 5 |
| 29 | 2º | não usa | 194 | 12 |
| 41 | 2º | não usa | 172 | 6 |
| 54 | 2º | não usa | 176 | 10 |
| 68 | 2º | não usa | 178 | 6 |
| 74 | 2º | não usa | 152 | 10 |
| 80 | 2º | não usa | 188 | 8 |
| 83 | 2º | não usa | 168 | 10 |
| 84 | 2º | não usa | 169 | 4 |
| 88 | 2º | não usa | 171 | 15 |
| 89 | 2º | não usa | 195 | 8 |
| 90 | 2º | não usa | 170 | 8 |
| 91 | 2º | não usa | 172 | 8 |
| 93 | 2º | não usa | 147 | 8 |
| 96 | 2º | não usa | 174 | 8 |
| 97 | 2º | não usa | 176 | 5 |
| 100 | 2º | não usa | 170 | 6 |
| 109 | 2º | não usa | 146 | 12 |
| 118 | 2º | não usa | 188 | 12 |
| 120 | 2º | não usa | 180 | 8 |
| 122 | 2º | não usa | 171 | 10 |
| 126 | 2º | não usa | 134 | 5 |

CARACTERÍSTICAS DOS INDIVÍDUOS COM RETARDO DO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO PUBERAL (RCCDP)

| Nº | Artigo | DROGAS Em uso | IDADE meses | TESTÍCULOS em ml |
|-----|---------|------------------|----------------|---------------------|
| 3 | 1º e 2º | não usa | 197 | 3 |
| 7 | 1º e 2º | não usa | 168 | 3 |
| 10 | 1º e 2º | não usa | 172 | 2 |
| 15 | 1º e 2º | não usa | 164 | 2 |
| 18 | 1º e 2º | não usa | 166 | 3 |
| 28 | 1º e 2º | não usa | 149 | 1 |
| 31 | 1º e 2º | não usa | 155 | 2 |
| 37 | 2º | não usa | 168 | 3 |
| 43 | 2º | não usa | 149 | 2 |
| 47 | 1º e 2º | não usa | 187 | 3 |
| 48 | 1º e 2º | não usa | 176 | 2 |
| 49 | 1º e 2º | não usa | 169 | 2 |
| 56 | 1º e 2º | não usa | 173 | 3 |
| 72 | 2º | não usa | 172 | 3 |
| 76 | 1º e 2º | não usa | 160 | 3 |
| 92 | 1º e 2º | não usa | 181 | 3 |
| 94 | 2º | não usa | 172 | 3 |
| 104 | 2º | não usa | 174 | 3 |

CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO COMPLETO ISOLADO (HHI)

| Nº | Artigo | Drogas Em uso | Idade meses | Testículos em ml | Testosterona ng/ml | LH Basal UI/ml | FSH Basal UI/ml |
|-----|---------|------------------|----------------|---------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| 19 | 1º e 2º | não usa | 371 | 2 | 0,07 | 0,10 | 1,00 |
| 25 | 2º | não usa | 180 | 3 | 0,01 | 1,10 | 1,10 |
| 26 | 1º e 2º | não usa | 219 | 1 | 0,01 | 1,10 | 1,10 |
| 46 | 1º e 2º | não usa | 218 | 3 | 0,10 | 0,14 | 0,70 |
| 65 | 1º e 2º | não usa | 404 | 2 | 0,27 | 0,10 | 0,10 |
| 86 | 1º e 2º | não usa | 214 | 2 | 0,17 | 0,10 | 0,10 |
| 102 | 1º e 2º | não usa | 210 | 3 | 0,04 | 0,10 | 0,37 |
| 121 | 1º e 2º | não usa | 241 | 2 | 0,21 | 0,10 | 0,10 |
| 124 | 2º | não usa | 253 | 3 | - | 0,70 | 0,41 |
| 203 | 2º | não usa | 230 | 1 | 0,05 | 0,26 | 0,21 |
| 217 | 1º e 2º | não usa | 324 | 2 | 0,12 | 0,73 | 0,13 |
| 239 | 1º e 2º | não usa | 320 | 2 | 0,02 | 0,59 | 0,21 |
| 261 | 1º e 2º | não usa | 283 | 3 | 0,16 | 0,10 | 2,24 |

**CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM
HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO COMPLETO
COMBINADO COM OUTRAS DEFICIÊNCIAS
HIPOTALÂMICAS E/OU HIPOFISÁRIAS (HHcC)**

| Nº | Artigo | Drogas Em uso | Idade meses | Testículos em ml | Testosterona ng/ml | LH Basal UI/ml | FSH Basal UI/ml |
|-----|---------|---------------------------|----------------|---------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| 8 | 2º | hGH + T ₄ | 206 | 3 | - | 0,10 | 0,10 |
| 12 | 1º e 2º | hGH | 183 | 1 | 0,06 | 0,10 | 0,33 |
| 30 | 1º e 2º | hGH+T ₄ +Pred. | 213 | 2 | 0,05 | 0,10 | 0,33 |
| 44 | 1º e 2º | hGH + T ₄ | 208 | 3 | 0,10 | 0,73 | 2,20 |
| 71 | 1º e 2º | hGH+T ₄ +Pred. | 201 | 1 | 0,05 | 0,10 | 0,10 |
| 85 | 1º e 2º | hGH+T ₄ +Pred. | 225 | 3 | 0,59 | 0,10 | 0,10 |
| 110 | 2º | T ₄ | 217 | 2 | 0,10 | 0,11 | 0,59 |
| 201 | 1º e 2º | T ₄ | 190 | 3 | 0,24 | 0,36 | 0,95 |
| 202 | 1º e 2º | T ₄ | 223 | 1 | 0,03 | 0,10 | 0,10 |
| 205 | 1º e 2º | T ₄ | 253 | 1 | 0,07 | 0,28 | 1,03 |
| 206 | 1º e 2º | não usa | 220 | 3 | - | 0,10 | 0,61 |
| 207 | 1º e 2º | T ₄ | 222 | 2 | 0,06 | 0,10 | 0,10 |
| 208 | 1º e 2º | hGH+T ₄ +Pred. | 206 | 1 | 0,05 | 0,10 | 0,10 |
| 214 | 1º e 2º | T ₄ | 232 | 2 | 0,04 | 0,10 | 0,19 |
| 216 | 1º e 2º | T ₄ | 303 | 2 | 0,25 | 1,42 | 1,88 |
| 225 | 1º e 2º | hGH+T ₄ +Pred. | 241 | 1 | 0,02 | 0,55 | 0,10 |
| 226 | 1º e 2º | hGH+T ₄ +Pred. | 299 | 4 | 0,01 | 0,10 | 0,10 |
| 228 | 1º e 2º | T ₄ | 284 | 4 | 0,26 | 0,28 | 0,68 |
| 229 | 1º e 2º | T ₄ | 264 | 4 | 0,02 | 0,10 | 0,10 |
| 233 | 1º e 2º | T ₄ | 269 | 3 | 0,05 | 0,10 | 0,39 |
| 240 | 1º e 2º | hGH+T ₄ +Pred. | 469 | 2 | 0,02 | 0,10 | 0,10 |

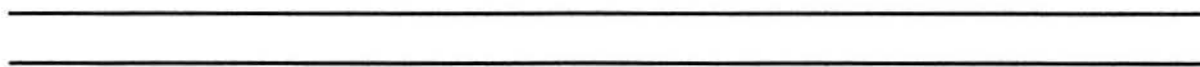
Pred. = Prednisona

**CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM
HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO PARCIAL
COMBINADO COM OUTRAS DEFICIÊNCIAS
HIPOTALÂMICAS E/OU HIPOFISÁRIAS (HHpC)**

| Nº | Artigo | Drogas Em uso | Idade meses | Testículos em ml | Testosterona ng/ml | LH Basal UI/ml | FSH Basal UI/ml |
|-----------|---------------|---------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 38 | 1º e 2º | hGH + T ₄ | 195 | 8 | 0,05 | 0,10 | 0,87 |
| 39 | 1º e 2º | T ₄ | 216 | 12 | 4,10 | 1,30 | 2,10 |
| 45 | 1º e 2º | hGH + T ₄ | 220 | 5 | | 0,10 | 0,35 |
| 62 | 1º e 2º | hGH | 204 | 8 | 0,47 | 1,30 | 1,60 |
| 114 | 2º | hGH | 234 | 12 | 0,62 | 0,10 | 0,68 |
| 204 | 1º e 2º | não usa | 229 | 4 | 0,11 | 0,61 | 4,22 |
| 209 | 1º e 2º | não usa | 247 | 9 | | 0,36 | 0,96 |
| 210 | 1º e 2º | T ₄ | 234 | 6 | | 0,10 | 1,07 |
| 223 | 1º e 2º | não usa | 408 | 0 | 0,98 | 1,41 | 3,21 |
| 237 | 2º | hGH+T ₄ +Pred. | 326 | 4 | 0,02 | 0,10 | 0,14 |

Pred. = Prednisona

ANEXO III



MENINOS PRÉ-PÚBERES NORMAIS COM IDADE ENTRE 6 E 8 ANOS

VALORES DA SUBUNIDADE ALFA LIVRE DOS HORMÔNIOS
GLICOPROTÉICOS ANTES (BASAL), TRINTA (30') E SESSENTA (60')
MINUTOS APÓS ESTÍMULO COM GnRH, VALOR MÁXIMO ATINGIDO
(PICO) E VALOR DA PBR α (PICO/BASAL)

| Nº | Artigo | BASAL ng/L | 30' ng/L | 60' ng/L | PICO ng/L | PBR α |
|-----|---------|---------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 222 | 1º e 2º | 75 | 662 | 387 | 662 | 8,83 |
| 231 | 1º e 2º | 66 | 480 | 443 | 480 | 7,27 |
| 238 | 1º e 2º | 89 | 300 | 254 | 300 | 3,37 |
| 245 | 2º | 69 | 425 | 343 | 425 | 6,16 |
| 244 | 2º | 86 | 547 | 441 | 547 | 6,36 |
| 260 | 2º | 43 | 185 | 162 | 185 | 4,3 |
| 125 | 2º | 119 | 1360 | 746 | 1360 | 11,43 |
| 259 | 2º | 82 | 388 | 361 | 388 | 4,73 |
| 258 | 2º | 71 | 467 | 407 | 467 | 6,58 |
| 243 | 2º | 56 | 347 | 280 | 347 | 6,2 |
| 256 | 2º | 29 | 267 | 212 | 267 | 9,21 |
| 255 | 2º | 89 | 539 | 356 | 539 | 6,06 |
| 254 | 2º | 55 | 245 | 188 | 245 | 4,45 |
| 252 | 2º | 160 | 1291 | 834 | 1291 | 8,07 |
| 251 | 2º | 54 | 393 | 321 | 393 | 7,28 |
| 249 | 2º | 42 | 572 | 232 | 572 | 13,62 |
| 247 | 2º | 57 | 487 | 376 | 487 | 8,54 |
| 257 | 2º | 50 | 241 | 318 | 318 | 6,36 |
| 236 | 2º | 47 | 376 | 354 | 376 | 8 |
| 32 | 2º | 563 | 5123 | 4511 | 5123 | 9,1 |
| 230 | 2º | 233 | 1353 | 681 | 1353 | 5,81 |
| 246 | 2º | 65 | 401 | 424 | 424 | 6,52 |
| 227 | 2º | 102 | 727 | 461 | 727 | 7,13 |
| 232 | 2º | 56 | 413 | 260 | 413 | 7,37 |
| 212 | 2º | 38 | 444 | 324 | 444 | 11,68 |
| 221 | 2º | 54 | 505 | 346 | 505 | 9,35 |
| 242 | 2º | 45 | 279 | 279 | 279 | 6,2 |
| 219 | 2º | 50 | 483 | 350 | 483 | 9,66 |
| 218 | 2 | 59 | 382 | 364 | 382 | 6,47 |
| 215 | 2 | 58 | 281 | 237 | 281 | 4,84 |
| 213 | 2 | 90 | 1046 | 572 | 1046 | 11,62 |
| 211 | 2 | 34 | 597 | 559 | 597 | 17,56 |
| 241 | 2 | 49 | 240 | 205 | 240 | 4,9 |
| 234 | 2 | 116 | 1055 | 687 | 1055 | 9,09 |

MENINOS PRÉ-PÚBERES NORMAIS COM IDADE ENTRE 9 E 13 ANOS

VALORES DA SUBUNIDADE ALFA LIVRE DOS HORMÔNIOS
GLICOPROTÉICOS ANTES (BASAL), TRINTA (30') E SESSENTA (60')
MINUTOS APÓS ESTÍMULO COM GnRH, VALOR MÁXIMO ATINGIDO
(PICO) E VALOR DA PBR α (PICO/BASAL)

| Nº | Artigo | BASAL ng/L | 30' ng/L | 60' ng/L | PICO ng/L | PBR α |
|-----|---------|---------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 4 | 1º e 2º | 209 | 1316 | 744 | 1316 | 6,3 |
| 20 | 1º e 2º | 66 | 477 | 421 | 477 | 7,23 |
| 64 | 2º | 102 | 1422 | 725 | 1422 | 13,94 |
| 40 | 1º e 2º | 306 | 3222 | 2136 | 3222 | 10,53 |
| 34 | 1º e 2º | 197 | 1328 | 1195 | 1328 | 6,74 |
| 78 | 1º e 2º | 146 | 840 | 525 | 840 | 5,75 |
| 21 | 2º | 320 | 3410 | 2431 | 3410 | 10,66 |
| 6 | 2º | 91 | 1168 | 653 | 1168 | 12,84 |
| 24 | 1º e 2º | 210 | 1496 | 1074 | 1496 | 7,12 |
| 69 | 1º e 2º | 198 | 645 | 571 | 645 | 3,26 |
| 66 | 1º e 2º | 95 | 988 | 0 | 988 | 10,4 |
| 73 | 2º | 114 | 1334 | 901 | 1334 | 11,7 |
| 248 | 1º e 2º | 142 | 647 | 509 | 647 | 4,56 |
| 70 | 1º e 2º | 173 | 1405 | 686 | 1405 | 8,12 |
| 82 | 2 | 61 | 690 | 450 | 690 | 11,31 |
| 115 | 2 | 67,5 | 910 | 500 | 910 | 13,48 |
| 113 | 2 | 170 | 914 | 708 | 914 | 5,38 |
| 13 | 2 | 194 | 2374 | 1688 | 2374 | 12,24 |
| 67 | 2 | 48 | 418 | 293 | 418 | 8,71 |
| 58 | 2 | 194 | 1230 | 768 | 1230 | 6,34 |
| 57 | 2 | 176 | 1467 | 831 | 1467 | 8,34 |
| 55 | 2 | 198 | 1310 | 1047 | 1310 | 6,62 |
| 95 | 2 | 93,5 | 996 | 596 | 996 | 10,65 |
| 79 | 2 | 109 | 1142 | 555 | 1142 | 10,48 |
| 107 | 2 | 194,5 | 2590 | 1881 | 2590 | 13,32 |

MENINOS NORMAIS EM PUBERDADE

VALORES DA SUBUNIDADE ALFA LIVRE DOS HORMÔNIOS GLICOPROTÉICOS ANTES (BASAL), TRINTA (30') E SESSENTA (60') MINUTOS APÓS ESTÍMULO COM GnRH, VALOR MÁXIMO ATINGIDO (PICO) E VALOR DA PBR α (PICO/BASAL)

| Nº | Artigo | BASAL ng/L | 30' ng/L | 60' ng/L | PICO ng/L | PBR α |
|-----|--------|---------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 29 | 2º | 50 | 691 | 237 | 691 | 13,82 |
| 90 | 2º | 81,5 | 395 | 237 | 395 | 4,85 |
| 91 | 2º | 60 | 326 | 203 | 326 | 5,43 |
| 96 | 2º | 61,5 | 400 | 228 | 400 | 6,5 |
| 22 | 2º | 224 | 1455 | 952 | 1455 | 6,5 |
| 97 | 2º | 72 | 513 | 240 | 513 | 7,13 |
| 17 | 2º | 155 | 523 | 310 | 523 | 3,37 |
| 109 | 2º | 216,5 | 1717 | 590 | 1754 | 8,1 |
| 89 | 2º | 78,5 | 752 | 470 | 752 | 9,58 |
| 1 | 2º | 177 | 1174 | 1078 | 1174 | 6,63 |
| 118 | 2º | 343 | 2391 | 1249 | 2891 | 8,43 |
| 11 | 2º | 113 | 1084 | 475 | 1084 | 9,59 |
| 100 | 2º | 76 | 605 | 299 | 605 | 7,96 |
| 88 | 2º | 54 | 543 | 332 | 543 | 10,06 |
| 54 | 2º | 143 | 1695 | 1218 | 1695 | 11,85 |
| 68 | 2º | 139 | 1449 | 939 | 1449 | 10,42 |
| 120 | 2º | 280 | 1655 | 1233 | 1655 | 5,91 |
| 74 | 2º | 99 | 1098 | 799 | 1098 | 11,09 |
| 41 | 2º | 245 | 1347 | 791 | 1347 | 5,5 |
| 80 | 2º | 49,5 | 545 | 250 | 545 | 11,01 |
| 83 | 2º | 75 | 1162 | 466 | 1162 | 15,49 |
| 93 | 2º | 52,5 | 478 | 333 | 478 | 9,1 |
| 84 | 2º | 198 | 1063 | 660 | 1063 | 5,36 |
| 126 | 2º | 167 | 1655 | 1362 | 1655 | 9,91 |
| 122 | | 153 | 1123 | 605 | 1123 | 7,34 |

**INDIVÍDUOS COM RETARDO DO CRESCIMENTO E
DESENVOLVIMENTO PUBERAL (RCCDP)**
VALORES DA SUBUNIDADE ALFA LIVRE DOS HORMÔNIOS
GLICOPROTÉICOS ANTES (BASAL), TRINTA (30') E SESSENTA (60')
MINUTOS APÓS ESTÍMULO COM GnRH, VALOR MÁXIMO ATINGIDO
(PICO) E VALOR DA PBR α (PICO/BASAL)

| Nº | Artigo | BASAL ng/L | 30' ng/L | 60' ng/L | PICO ng/L | PBR α |
|-----|---------|---------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 94 | 2º | 93 | 1083 | 619 | 1083 | 11,65 |
| 56 | 1º e 2º | 301 | 3082 | 2165 | 3082 | 10,24 |
| 92 | 1º e 2º | 75 | 450 | 263 | 450 | 6 |
| 28 | 1º e 2º | 255 | 1467 | 1065 | 1467 | 5,75 |
| 31 | 1º e 2º | 143 | 1036 | 653 | 1036 | 7,24 |
| 76 | 1º e 2º | 99 | 834 | 432 | 834 | 8,42 |
| 43 | 2º | 150 | 2269 | 1972 | 2269 | 15,13 |
| 48 | 1º e 2º | 243 | 1479 | 971 | 1479 | 6,07 |
| 72 | 2º | 73 | 1008 | 472 | 1008 | 13,81 |
| 47 | 1º e 2º | 265 | 1052 | 1701 | 1701 | 6,42 |
| 49 | 1º e 2º | 213 | 839 | 618 | 839 | 3,94 |
| 37 | 2º | 304 | 3253 | 2313 | 3253 | 10,7 |
| 7 | 1º e 2º | 150 | 1151 | 730 | 1151 | 7,67 |
| 18 | 1º e 2º | 129 | 921 | 468 | 921 | 7,14 |
| 15 | 1º e 2º | 234 | 1381 | 661 | 1381 | 5,9 |
| 104 | 2º | 197 | 2276 | 1605 | 2276 | 11,55 |
| 3 | 1º e 2º | 64 | 514 | 346 | 514 | 8,03 |
| 10 | 1º e 2º | 185 | 577 | 316 | 577 | 3,12 |

**PACIENTES COM HIPOGONADISMO
HIPOGONADOTRÓFICO COMPLETO ISOLADO (HHI)
VALORES DA SUBUNIDADE ALFA LIVRE DOS HORMÔNIOS
GLICOPROTÉICOS ANTES (BASAL), TRINTA (30') E SESSENTA (60')
MINUTOS APÓS ESTÍMULO COM GnRH, VALOR MÁXIMO ATINGIDO
(PICO) E VALOR DA PBR α (PICO/BASAL)**

| Nº | Artigo | BASAL ng/L | 30' ng/L | 60' ng/L | PICO ng/L | PBR α |
|-----|---------|---------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 86 | 1º e 2º | 111 | 230 | 185 | 230 | 2,07 |
| 203 | 2º | 52 | 142 | 113 | 142 | 2,73 |
| 121 | 1º e 2º | 285,5 | 432 | 417 | 491 | 1,72 |
| 25 | 2º | 65 | 310 | 238 | 310 | 4,77 |
| 261 | 1º e 2º | 35 | 124 | 121 | 124 | 3,54 |
| 217 | 1º e 2º | 77 | 229 | 157 | 229 | 2,97 |
| 239 | 1º e 2º | 224 | 311 | 263 | 311 | 1,39 |
| 65 | 1º e 2º | 107 | 233 | 246 | 246 | 2,3 |
| 26 | 1º e 2º | 144 | 403 | 277 | 403 | 2,8 |
| 102 | 1º e 2º | 115 | 236 | 175 | 236 | 2,05 |
| 19 | 1º e 2º | 115 | 308 | 264 | 308 | 2,68 |
| 46 | 1º e 2º | 99 | 476 | 383 | 476 | 4,81 |
| 124 | 2º | 96,5 | 250 | 213 | 285 | 2,95 |

**PACIENTES COM HIPOGONADISMO
HIPOGONADOTRÓFICO COMPLETO COMBINADO COM
OUTRAS DEFICIÊNCIAS HIPOTALÂMICAS E/OU
HIPOFISÁRIAS (HHcC)**

VALORES DA SUBUNIDADE ALFA LIVRE DOS HORMÔNIOS
GLICOPROTÉICOS ANTES (BASAL), TRINTA (30') E SESSENTA (60')
MINUTOS APÓS ESTÍMULO COM GnRH, VALOR MÁXIMO ATINGIDO
(PICO) E VALOR DA PBR α (PICO/BASAL)

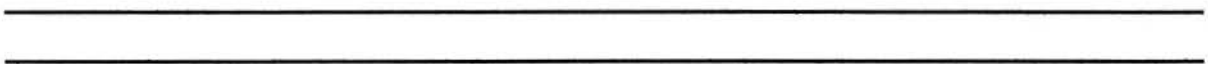
| Nº | Artigo | BASAL ng/L | 30' ng/L | 60' ng/L | PICO ng/L | PBR α |
|-----|---------|---------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 208 | 1º e 2º | 19 | 30 | 30 | 30 | 1,58 |
| 240 | 1º e 2º | 86 | 131 | 136 | 136 | 1,58 |
| 214 | 1º e 2º | 25 | 50 | 51 | 51 | 2,04 |
| 233 | 1º e 2º | 78 | 106 | 95 | 106 | 1,36 |
| 8 | 2º | 44 | 85 | 66 | 85 | 1,93 |
| 229 | 1º e 2º | 99 | 125 | 119 | 125 | 1,26 |
| 12 | 1º e 2º | 272 | 470 | 380 | 470 | 1,73 |
| 225 | 1º e 2º | 39 | 47 | 45 | 47 | 1,21 |
| 228 | 1º e 2º | 230 | 280 | 249 | 280 | 1,22 |
| 216 | 1º e 2º | 89 | 263 | 239 | 263 | 2,96 |
| 201 | 1º e 2º | 59 | 144 | 100 | 144 | 2,44 |
| 30 | 1º e 2º | 93 | 129 | 129 | 129 | 1,39 |
| 226 | 1º e 2º | 86 | 166 | 95 | 166 | 1,93 |
| 44 | 1º e 2º | 220 | 418 | 471 | 471 | 2,14 |
| 207 | 1º e 2º | 32 | 36 | 50 | 50 | 1,56 |
| 85 | 1º e 2º | 76 | 99 | | 99 | 1,3 |
| 206 | 1º e 2º | 99 | 284 | 226 | 284 | 2,87 |
| 202 | 1º e 2º | 25 | 44 | 35 | 44 | 1,76 |
| 71 | 1º e 2º | 76 | 116 | 99 | 116 | 1,53 |
| 205 | 1º e 2º | 80 | 105 | 93 | 105 | 1,31 |
| 110 | 2º | 140,5 | 177 | 177 | 182 | 1,3 |

**PACIENTES COM HIPOGONADISMO
HIPOGONADOTRÓFICO PARCIAL COMBINADOS COM
OUTRAS DEFICIÊNCIAS HIPOTALÂMICAS E/OU
HIPOFISÁRIAS (HHpC)**

VALORES DA SUBUNIDADE ALFA LIVRE DOS HORMÔNIOS
GLICOPROTÉICOS ANTES (BASAL), TRINTA (30') E SESSENTA (60')
MINUTOS APÓS ESTÍMULO COM GnRH, VALOR MÁXIMO ATINGIDO
(PICO) E VALOR DA PBR α (PICO/BASAL)

| Nº | Artigo | BASAL ng/L | 30' ng/L | 60' ng/L | PICO ng/L | PBR α |
|-----|---------|---------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 237 | 2º | 120 | 206 | 253 | 253 | 2,11 |
| 45 | 1º e 2º | 77 | 246 | 213 | 246 | 3,19 |
| 209 | 1º e 2º | 103 | 217 | 188 | 217 | 2,11 |
| 62 | 1º e 2º | 150 | 311 | 269 | 311 | 2,07 |
| 210 | 1º e 2º | 66 | 215 | 159 | 215 | 3,26 |
| 111 | 2º | 236 | 450 | 322 | 526 | 2,23 |
| 204 | 1º e 2º | 107 | 277 | 262 | 277 | 2,59 |
| 223 | 1º e 2º | 59 | 161 | 143 | 161 | 2,73 |
| 38 | 1º e 2º | 280 | 481 | 392 | 481 | 1,72 |
| 39 | 1º e 2º | 215 | 665 | 415 | 665 | 3,09 |

ANEXO IV



**HYPOGONADOTROPIC HYPOGONADISM IS DIAGNOSED BY THE
PEAK/BASAL RATIO OF THE FREE α -SUBUNIT (PBR α)**

ALBERTO SCOFANO MAINIERI, M.D., M.Sc.

Serviço de Medicina do Adolescente

REGINA HELENA ELNECAVE, M.D., Ph.D.

Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) - Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Regina Helena Elnecave

Serviço de Endocrinologia -HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350 , Prédio 12, 4o andar

90035-003 - Porto Alegre, RS, Brazil

This work was supported in part by grants received by the UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) Graduate Program in Endocrinology, from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).

HYPOGONADOTROPIC HYPOGONADISM AND PBR α

ABSTRACT

It has been shown that the relationship between the peak GnRH-stimulated and the basal serum levels of the Free α -Subunit (FAS) differentiates men with Hypogonadotropic Hypogonadism (HH) from normal prepubertal boys. The aim of this study is to evaluate the test performance for diagnostic purposes.

FAS levels of 34 healthy prepubertal males and 38 men with HH were measured before, 30 and 60' after an IV bolus of GnRH. Peak/Basal Ratio of Free α -Subunit. (PBR α), the maximal serum level of FAS (Peak) divided by its basal level (Basal) was evaluated. Performance measurements, i.e., sensitivity and specificity, was evaluated by the ROC curve.

Individual data of every normal subject and patient with HH determined the area under the ROC curve of 0.992. PBR α \leq 3.26 define HH with 94.7% sensitivity and 94.1% specificity.

The high sensitivity and specificity found are capable to identify individuals with HH, allowing the use of PBR α in clinical practice. The capacity to release FAS may be a better marker of pituitary gonadotropic function than that of intact LH.

KEY WORDS

Free α - Subunit; hypogonadotropic hypogonadism; delayed puberty

INTRODUCTION

The diagnosis of Hypogonadotropic Hypogonadism (HH) in men under the age of 18 yr. is difficult, since the clinical and hormonal features are similar to those found in Constitutional Delay of Growth and Puberty (CDGP) (1, 2).

Pubertal delay occurs in 3% of normal children (2). CDGP is more frequent in males, in whom it corresponds to 95% of the causes of delayed puberty(3). In CDGP the onset of the hormonal and physical changes of puberty are delayed, yet normal (4) and low serum levels of gonadotropins are detected until these modifications begin. HH is also featured by hypodevelopment of the secondary sex characteristics and low serum levels of gonadotropins, that occur due to the absent or insufficient secretion of Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) and/or of Luteinizing Hormone (LH) and Follicle-Stimulating Hormone (FSH) (4). A definite clinical diagnosis of HH is only established in male subjects when they reach the age of 18 yr. with no initial signs or show no progression of their puberty (5).

Several studies have looked at changes of LH and FSH, both spontaneous and stimulated, in the attempt to differentiate HH from CDGP (3, 4, 6-13). Multiple blood sampling and prolonged testing time (6, 7, 10), high cost of the drugs used as stimulus (14) and, above all, overlapping results (13). make these tests inadequate for clinical practice.

We have previously reported that the relationship of the peak GnRH-stimulated and the basal serum levels of the Free α -Subunit (FAS) is higher in normal boys, 6-8 yr. (controls) than in adult men with HH (15), with no overlapping results.

The aim of this study was to validate this test, using a larger sample of HH men, having normal and CDGP prepubertal boys as controls.

METHODS

This diagnostic test study was conducted in 34 normal individuals and 38 men with HH.

Thirty-four young men aged 8-16 yr. were studied as controls, They were all tested before any pubertal signs were evident and followed until puberty had started. In 17 of them, puberty began before the age of 14 yr. and in 17, after they had turned 14 yr. thus considered as having CDGP. Growth was appropriate for either chronological or bone ages. They were otherwise healthy and had no organic disease that could impair their development. Young men with histories of chronic diseases, genetic syndromes, brain tumours, head trauma, surgery and/or radiation therapy, use of anticonvulsants or hormonal preparations were excluded.

Thirty-eight men aged 16-39 yr. who, at the age of at least 18 yr., had testicular volumes under 4 ml, or didn't show signs of pubertal progression for a period of at least two years, and had low serum gonadotropin levels, composed the group with HH. Among these, 26 had panhypopituitarism and were receiving hormonal replacements accordingly, 2 had panhypopituitarism and were not receiving hormones and 10 had isolated HH. None had received testosterone replacement for five months prior to the test. At the time the test was performed all patients were either prepubertal or their puberty was arrested. Patients with tumours of the hypothalamic-pituitary region and/or who had pituitary surgery, or those who had received cranial irradiation were excluded. All patients were followed until the confirmation of their clinical diagnosis of HH. In some cases the follow up period extended to 4 years.

The test involves the determination of the Peak/Basal Ratio of the Free α -Subunit ($PBR\alpha$) after a single intravenous bolus of GnRH. $PBR\alpha$ is the maximal (Peak) serum level of FAS divided by the serum level of FAS at baseline (Basal).

Blood for FAS determinations was drawn prior (basal), 30 and 60 minutes after the intravenous injection of 100 μ g GnRH (RELISORM® L, Serono; Barueri, SP). Serum was frozen at -20°C and stored until assayed. FAS measurements were done in duplicates, using the immunofluorimetric method already described (15, 16), with intra-assay CV < 5% and inter-assay CV = 5%. The assay is sensitive to levels of FAS = 0.1 IU/L. Standards were calibrated by the First IRP, [78/569] National Institute for Biological Standards and Control, Potter Bar, UK.)

Medians with intervals limited by the 25th and the 75th percentiles (P25-P75) are reported. Test performance measurements, i.e., sensitivity and specificity, was calculated. Confidence intervals were determined through binomial distribution. A ROC (Receiver Operating Characteristics) curve (17) was calculated and the results are presented as the 95% confidence interval, the mean and the Standard Error ($\bar{x} \pm SE$). Data were analysed and processed with the aid of the program MEDCALC®.

This study was approved by the IRB of our hospital. All patients have signed an Informed Consent Form.

RESULTS

In normal subjects the median (P25-P75) Peak/Basal Ratio of the Free α -Subunit (PBR α) was 7.25 (6.00-10.53). In five of these subjects PBR α values were lower than the highest one found in HH patients. (Fig 1)

In patients with HH the median (P25-P75) PBR α was 2.06 (1.56-2.73). In four of these patients PBR α values were higher than the lowest one found in normal subjects. (Fig 1)

The individual PBR α data of every normal subject and patient with HH determined the area under the ROC curve of 0.934 to 0.996 (0.992 \pm 0.011). (Fig 2).

PBR α \leq 3.09 define HH with 89.5% (75.2-97.0) sensitivity and 100.0% (100.0-100.0) specificity. PBR α \leq 4.81 define HH with 100.0% (100.0-100.0) sensitivity and 85.3% (68.9-95.0) specificity. The cutoff point that associates higher sensitivity and specificity is PBR α = 3.26. PBR α \leq 3.26 define HH with 94.7% (82.6-99.2) sensitivity and 94.1% (80.3-99.1) specificity.

DISCUSSION

The present study demonstrates that the evaluation of the relative response of the serum levels of the Free α -Subunit (FAS) is an accurate method for the diagnosis of HH.

The results above show that Peak/Basal Ratio of the Free α -Subunit (PBR α) warrants the distinction between normal prepubertal boys and individuals with HH, since PBR α values lower than 3.26 define HH with 5.3% false-negative results and 5.9% false-positive results. A robust test with high sensitivity and specificity, as this one, diagnoses HH in prepubertal men in almost every case. The existing overlap includes only 12.5% of the total number of the subjects evaluated, occurring in a small interval of PBR α values (3.09-4.81), and thus, does not invalidate its use in clinical practice (figure 1). Our results show that PBR α \leq 4.81 diagnoses HH with no false-negative and only 14.7% false-positive cases, and PBR α <3.09 diagnoses HH with no false-positive and only 10.5% false-negative cases.

The uncommon control group, composed of normal prepubertal boys and teenage males with CDGP, both states of transient “functional hypogonadotropic hypogonadism”, provided functional equivalence to the study group. This choice was important because at the time the test was performed, all individuals were clinically hypogonadal, but in one, puberty developed normally while in the other, it did not.

The similarities in the secretory pattern of FAS and the pituitary gonadotropins justify the study of the pituitary release of FAS after GnRH. The pituitary gonadotropins, thyrotropin and chorionic gonadotropin are glycoprotein hormones composed of two subunits α and β , the former being common to all of them (18). Although synthesised both in the gonadotrophs and in the thyrotrophs, the gonadotrophs synthesize it in greater amounts (19, 20). GnRH exerts a marked role in the secretion of FAS (21). FAS levels in peripheral blood rise from childhood to adulthood (22) and there is a significant correlation between the

secretions of LH and FSH and that of FAS (20-25). FAS is secreted in pulses both in normal adults (25) and in patients with HH (20), while the amplitude of the FAS pulses is significantly greater in normal subjects (19, 24).

So far, no single test reliably identifies patients with HH before the age of 18 yr. The greater discriminatory power of FAS when compared to LH and FSH may be due to some differences that exist between the intact gonadotropins and FAS. Despite the existing correlation of their secretion (20-23, 25), different responses to the same stimulus are reported (26, 27). Thus, a GnRH antagonist inhibits LH secretion with little or no effect in the secretion of FAS (27-29). It has been shown that the pituitary synthesises the α -subunit in excess of the β -subunits (30, 31), up to 8 times as much as the sum of all β -subunits(32), the β -subunit being the limiting factor in the synthesis of LH (33).

Thus, the capacity to release FAS may be a better marker of the pituitary gonadotropic function, than that the intact LH. In patients with hypothalamic HH, the absence of pituitary response to acute stimulation may be due to the lack of previous priming of the gland (34).

In conclusion, the measurement of FAS after GnRH and the calculation of $PBR\alpha$ is an accurate method for the diagnosis of HH in physically immature men.. The use of this test in women and men of different ages of those studied awaits further studies.

REFERENCES

- 1 - Crowley WF, Filicori M, Spratt DI, Santoro NF. 1985 The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. *Rec. Prog. in Horm. Res.*41:473-526.
- 2 - Whitcomb RW, Crowley JR. WF. 1993 Male hypogonadotropic hypogonadism. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 22 (1):125-144.
- 3 - Wood DF, Franks S. 1989 Delayed puberty. *Br. J. Hospital Med.* 41:223-230.
- 4 - Grumbach MM, Styne DM. 1992 Puberty: ontogeny, neuroendocrinology, physiology and disorders. In: Wilson JD, Foster DW. ed. *Williams textbook of endocrinology*. 8.ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company;1139-1222.
- 5 – Wyngaarden JB, Smith IHJr. 1990 *Tratado de medicina interna - Cecil*. 18.ed. Rio de Janeiro Guanabara Kogan S.A.
- 6 – Ehrmann DA, Rosenfield RL, Cuttler L, Burstein JFC. 1989 A new test of combined pituitary-testicular function using the gonadotropin-releasing hormone agonist nafarelin in the differentiation of gonadotropin deficiency from delayed puberty: pilot studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69 (5):963-967.
- 7 – Goji K, Tanikaze S. 1992 Comparison between spontaneous gonadotropin concentration profiles and gonadotropin response to low-dose gonadotropin-releasing hormone in prepubertal and early pubertal boys and patients with hypogonadotropic hypogonadism: assessment by using ultrasensitive, time-resolved immunofluorometric assay. *Pediatr. Res.*31 (5):535-539.
- 8 – Haavisto AM, Dunkel L, Pettersson K, Huhtaniemi I. 1990 LH measurements by in vitro bioassay and a highly sensitive immunofluorometric assay improve the distinction between boys with constitutional delay of puberty and hypogonadotropic hypogonadism. *Pediatr. Res.* 27(3):211-214.

- 9 - Radzan AK, Fang VS, Rich BH, 1979 Britton H, Rosenfield RL. Gonadotropin-releasing hormone infusion test in the distinction of hypopituitary patients from normal subjects. *Fertil. Steril.* 31 (5);507-512.
- 10 – Wu FCW, Butler GE, Kelnar CJH, Stirling HF, Huhtaniemi I. 1991 Patterns of pulsatile luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in prepubertal (midchildhood) boys and girls and patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann's syndrome): a study using an ultrasensitive time-resolved immunofluorometric assay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72 (6):1229-1237.
- 11 – Lanes R, Palacios A, Avendano E, Moncada G, Chique G. 1989 The metoclopramide test: a useful tool with the luteinizing hormone-releasing hormone test in distinguishing between constitutional delay of puberty and hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil. Steril.* 52 (1):55-59.
- 12 – Partsch CJ, Hermanussen M, Sippell WG. 1985 Differentiation of male hypogonadotropic hypogonadism and constitutional delay of puberty by pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60 (6):1196-1203.
- 13 – Smals AGH, Hermus ARM, Boers GHJ, Pieters GFF, Benraad THJ, Kloppenborg PWC. 1994 Predictive value of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) bolus testing before and after 36-hour pulsatile LHRH administration in the differential diagnosis of constitutional delay of puberty and male hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78 (3):602-608.
- 14 – Ghai K, Cara JF, Rosenfield RL. 1995 Gonadotropin releasing hormone agonist (Nafarelin) test to differentiate gonadotropin deficiency from constitutionally delayed puberty in teen-age boys - a clinical research center study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (10):2980-2986.

- 15 – Mainieri AS, Elnecave RH. 1998 Response of free alpha-subunit to GnRH distinguishes individuals with “functional” from those with permanent hypogonadotropic hypogonadism. *Horm.res.* 50:212-216.
- 16 - Vieira JGH, Nishida SK, Lombardi MT, Abucham JZ, Kasamatsu TS. 1995 Monoclonal antibodies specific for the free alpha subunit of glycoprotein hormones and their use in the development of a sensitive immunofluorometric assay. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28 (6):633-636.
- 17 – Bradley GW. 1981 *Disease Diagnosis e Decisions*. John Wiley & Sons; 1993.
- 18 - Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev. Biochem.* 50:465-472.
- 19 – Winters SJ, Troen P. 1990 Pituitary glycoprotein hormone α -subunit secretion after thyrotropin-releasing hormone stimulation in normal men and men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70 (2):544-547.
- 20 – Winters SJ, Troen P. 1988 α -subunit secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66 (2):338-342.
- 21 – Spratt DI, Chin WW, Ridgway EC, Ridgway EC, Crowley WF. 1986 Administration of low dose pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) to GnRH-deficient men regulates free α -subunit secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62 (1):102-108.
- 22 – Styne DM, Kaplan SL, Grumbach MM. 1980 Plasma glycoprotein hormone α -subunit in the neonate and in prepubertal and pubertal children: effects of luteinizing hormone-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50 (3):450-455.
- 23 – Samuels MH, Veldhuis JD, Henry P, Ridgway EC. 1990 Pathophysiology of pulsatile and copulsatile release of thyroid-stimulating hormone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and α -subunit. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71 (2):425-432.
- 24 – Whitcomb RW, O’Dea LS, Finkelstein JS, Heavern DN, Crowley WF. 1990 Utility of

Free Alpha-subunit as an Alternative Neuroendocrine Marker of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Stimulation of The Gonadotropin in the Human: Evidence from Normal and GnRH-Deficient Men. *J-Clin-Endocrinol-Metab.* 70 (6):1654-61.

25 – Winters SJ, Troen P. 1985 Pulsatile secretion of immunoreactive α -subunit in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60 (2):344-348.

26 – Haisenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, Marshall JC, Shupnik MA. 1991 A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology.* 128 (1):509-517.

27 – Lemay A, Lourdasamy M. 1991 Gonadotrophin releasing hormone agonist suppressive treatment of ovarian function decreases serum LH- α and bioactive LH but maintains elevated levels of LH- α . *Clin. Endocrinol.* 34:191-196.

28 – Lahlou N, Roger M, Chaussain JL et al. EJ. 1987 Gonadotropin and α -subunit secretion during long term pituitary suppression by D-Trp-luteinizing hormone-releasing hormone microcapsules as treatment of precocious puberty. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65 (5):946-953.

29 – Lindner J, Rivier JE, Vale WW, Pavlou SN. 1990 Regulation of pituitary glycoprotein α -subunit secretion after administration of a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70 (4):1219-1224.

30 - Kaplan SL, Grumbach MM, Aubert ML 1976 α and β glycoprotein hormone subunits (hLH, hFSH, hCG) in the serum and pituitary of the human fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42 (5):995-998.

31 - Prentice LG, Ryan RJ. 1975 LH and its subunits in human pituitary, serum and urine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40 (2):303 - 312.

32 - Kourides IA, Landon MB, Hoffman BJ, Weintraub BD. 1980 Excess free alpha relative

to beta subunits of the glycoprotein hormones in normal and abnormal human pituitary glands. *Clin. Endocrinol.* 12:407 - 416.

33 - Papavasiliou SS, Zmeili S, Khoury, S, Landfeld TD, Chin WW, Marshall JC. 1986 Gonadotropin-releasing hormone differentially regulates expression of the genes for luteinizing hormone alpha and beta subunits in male rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 (11):4026-4029.

34 – Valk TW, Corley KP, Kelch RP, Marshall JC. 1980 Hypogonadotropic hypogonadism: hormonal responses to low dose pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51 (4):730-738.

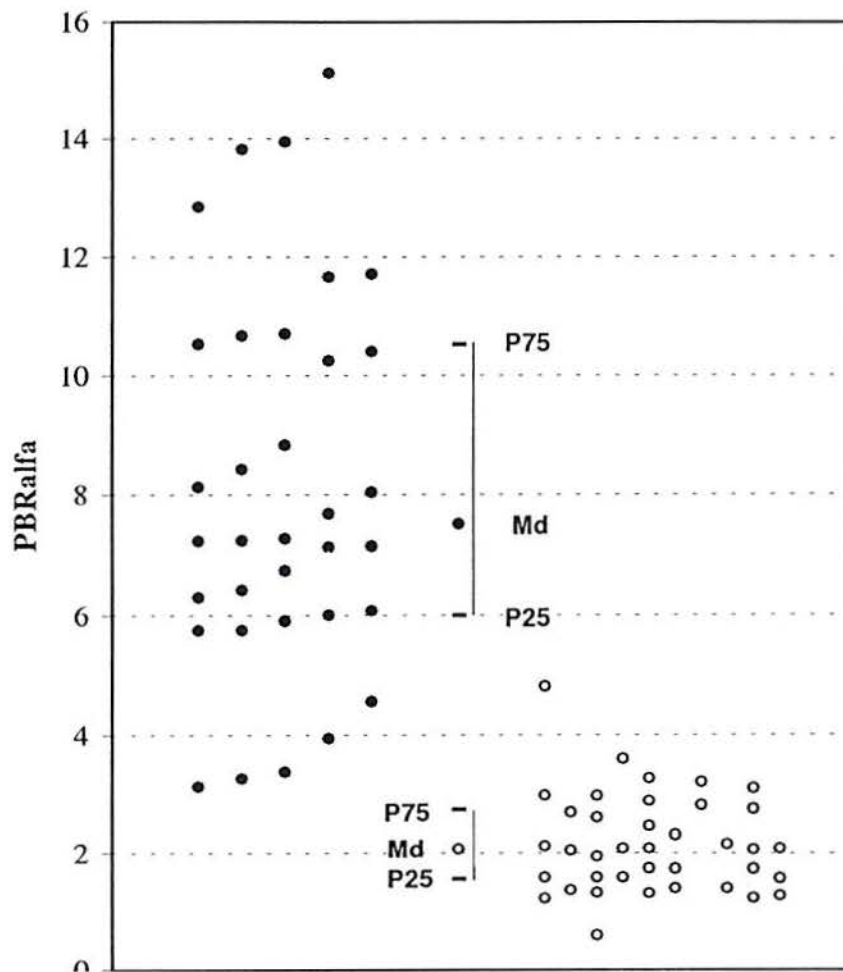


Figure 1 - Values of $PBR\alpha$ in patients with hypogonadotropic hypogonadism (O) and controls (●), with the respective medians (Md) and confidence intervals (P25-P75).

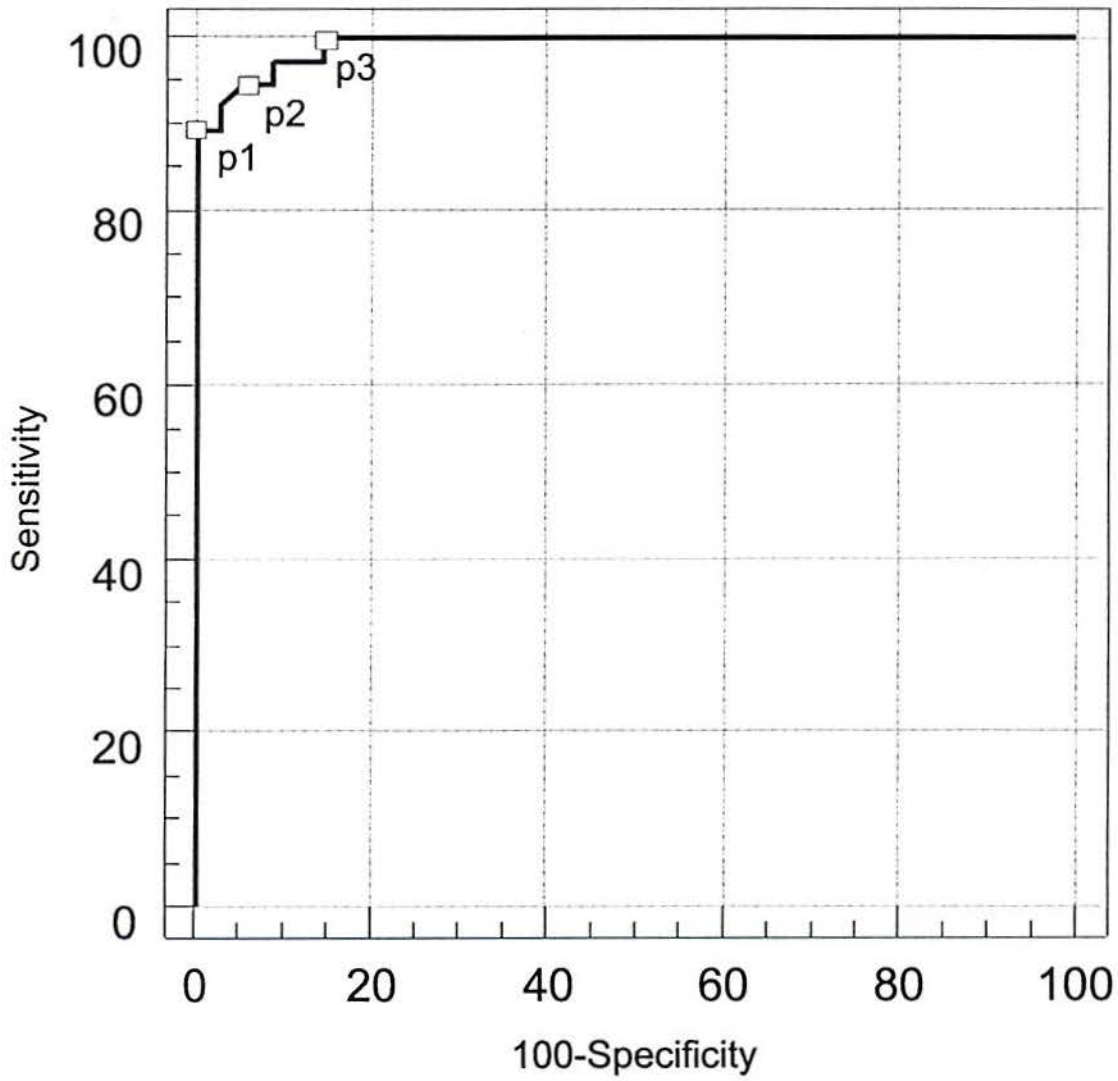
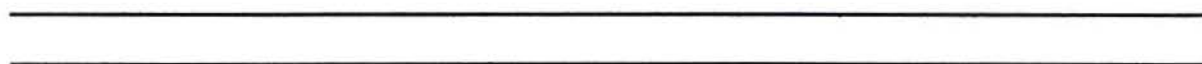


Figure 2 - ROC curve of PBRα values (n = 72), Cutoff points: p1 = 3.09; p2 = 3.26; p3 =

ANEXO V



THE ROLE OF PBR α IN THE EVALUATION OF BOYS WITH DELAYED PUBERTY

ALBERTO SCOFANO MAINIEIRI, MD

Serviço de Medicina do Adolescente

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

REGINA HELENA ELNECAVE, MD, PhD *

Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

* Corresponding and Reprint Request Author

Regina Helena Elnecave,

Serviço de Endocrinologia - HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Prédio 12, 4º andar

90035-003 Porto Alegre, RS

Brazil

Phones +55-51-3168127 (institutional)

+55-51-3321419 (home)

Fax: +55-51-3325188

e-mail: elnecave@zaz.com.br

This work was supported in part by grants received by the UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) Graduate Program in Endocrinology, from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).

Key words: Free α -subunit; Constitutional Delay of Growth and Puberty; hypogonadotropic hypogonadism

ABSTRACT

Objectives:

We have demonstrated that PBR α (Peak/Basal Ratio of the Free Alpha-Subunit of the glycoprotein hormones - FAS) identifies Hypogonadotropic Hypogonadism (HH) with high sensitivity and specificity. The objectives of this study are to assess the performance of PBR α in normal male individuals of different ages and pubertal development and in patients with isolated or combined HH.

Study design:

Serum FAS before (Basal), 30' and 60' after 100 ug IV GnRH were measured in male individuals: 84 normal pre-pubertal 6-13 yr.-old; 18 with Constitutional Delay of Growth and Puberty (CDGP); 13 with isolated HH (IHH); 21 with complete HH combined with other hormone deficiency(ies) (CcHH) and 10 with partial HH combined with other hormone deficiency(ies) (CpHH). Medians and P25-P75 ranges of PBR α were determined.

Results:

PBR α of CDGP subjects (7.46) is higher than those of IHH (2.73), CcHH (1.58) and CpHH (2.41) ($p < 0,001$). PBR α < 3.26 identifies HH with 93.2% sensitivity and 94.4% specificity, when compared to CDGP.

PBR α of pre-pubertal 6-8 yr.-old (7.20), 8-13 yr.- old (8.71), pubertal (8.10) and CDGP (7.46) males are not statistically different.

Conclusion:

Diagnosing HH irrespective of age, allows the use of PBR α for the differential diagnosis between CDGP and HH. This distinction enables early investigation and treatment of youngsters with HH and reassurance of those with CDGP.

ABBREVIATIONS

1. CcHH - complete Hypogonadotropic Hypogonadism Combined with deficiency(ies) of other hypothalamic/pituitary hormone(s)
2. CDGP - Constitutional Delay of Growth and Puberty
3. CpHH - partial Hypogonadotropic Hypogonadism Combined with deficiency(ies) of other hypothalamic/pituitary hormone(s)
4. FSH - Follicle-Stimulating Hormone
5. FAS - Free Alpha Subunit of the glycoprotein hormones
6. GnRH - Gonadotropin Releasing Hormone
7. HH - Hypogonadotropic Hypogonadism
8. H-P-G - Hypothalamic – Pituitary - Gonadal
9. IHH - Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism
10. LH - Luteinizing Hormone
11. P25 - P75 - 25th -75th percentiles
12. PBR α - Peak/Basal Ratio of the Free Alpha Subunit
13. ROC - Receiver Operating Characteristics
14. T₄ - Tetraiodothyronine
15. TSH - Thyroid Stimulating Hormone
16. TRH - Thyrotropin-Releasing Hormone

INTRODUCTION

Constitutional Delay of Growth and Puberty, the most common cause of delayed puberty in males, could be considered a state of transient physiological hypogonadotropic hypogonadism, often indistinguishable from the less common diagnosis of definite HH, until the age of 18 years. The identification of a marker of the pathophysiological diagnosis, is useful to guide the physician ordering further tests, in the case of HH, and reassuring the youngster and his family, in the case of CDGP.

We have demonstrated in previous studies that the relative response of the Free α -Subunit of the glycoprotein hormones to GnRH could distinguish pre-pubertal boys from men with definite HH (1) and that $PBR\alpha$, the ratio of peak-stimulated/basal FAS, < 3.26 diagnoses HH with 94.1% specificity and 94.7% sensitivity, with 100% sensitivity when $PBR\alpha \leq 4.81$ and 100% specificity when $PBR\alpha < 3.12$ (2).

Although a promising test for an important pathophysiological diagnosis, there are doubts concerning its performance in normal male individuals of different ages and pubertal development, an important determination for its validation.

Also, as the previous studies have used males with definite, complete HH, the partial forms of this condition, more difficult to diagnose and more often mistaken for a physiological delay of puberty, there is the need for studying the performance of $PBR\alpha$ in young men in whom puberty starts later than the expected mean age and/or progresses at a slower rate.

Another important definition to be made is that of the non-specificity of FAS, common to gonadotropins and thyrotropin, since many of the patients with HH previously studied had other hormonal deficiencies. This is also important in the case of patients receiving T_4 replacement, since it could be hypothesized that FAS could be suppressed and unresponsive.

MATERIAL AND METHODS

The serum levels of FAS, before and after a single GnRH bolus were evaluated in male subjects: 84 normal, 18 with CDGP and in 44 with HH (Table 1).

The group of normal subjects was composed by 34 pre-pubertal boys (studied between the ages of 6-8 yrs.), with physiologically suppressed H-P-G axis; 25 pre-pubertal boys (studied between the ages 9-13 yrs), with reactivated H-P-G axis and who later developed spontaneous and normal puberty; 25 boys aged 11-17 yrs. with early signs of puberty (testicular volume >4 ml and <15 ml, Tanner stages II and III) when studied; and followed to its completion. There was no evidence of any organic disease that could interfere with their growth or development.

The CDGP group was composed by 18 boys tested after the age of 14 yrs., when their testicular volume were still < 4 ml (pre-pubertal), in whom puberty had started spontaneously before the age of 18 yrs. and progressed normally thereafter. Those with organic diseases that could interfere in growth and development were excluded.

The HH group was composed by men older than 18 yrs. of age, with testicular volume < 4 ml or with arrested pubertal development in a 24 month follow up period, low serum gonadotropins and testosterone levels. Of those, 13 had isolated HH; 21 had deficiency(ies) of other hypothalamic and/or pituitary hormone(s) combined to complete - no testicular development during the observation period - HH ; 10 had deficiency(ies) of other hypothalamic and/or pituitary hormone(s) combined to a partial deficiency of gonadotropins - initial testicular development present, but non-progressive. Patients with brain tumors, surgery or radiation therapy, those using anticonvulsants were excluded. None of them had used testosterone preparations for at least 5 months prior to the test.

Normal and CDGP subjects were selected from those coming for routine visits at the pediatrics

and adolescent medicine outpatient clinics. HH patients were selected from the endocrinology outpatient clinic.

The test consisted of duplicate blood sampling before (Basal), 30' and 60' after a single IV bolus of 100ug GnRH (RELISORM® L, Serono; Barueri, SP). Serum samples were frozen at -20°C until FAS was assayed by immunofluorimetry (3). The assay's limit of detection was of 0,1 UI/L (4 ng/L), intra-assay CV < 5%, inter-assay CV = 5%. Standards were calibrated according to the First IRP[78/569] National Institute for Biological Standards and Control, Potter Bar, UK.).

After the measurements of the Basal and stimulated serum levels of FAS, its maximal level obtained was labeled as Peak, and the PBRa (Peak divided by Basal) was calculated.

Medians and P25-P75 ranges were established for each group. Results were compared using the Kruskal-Wallis test. Specificity and sensitivity were calculated for each group using $PBR\alpha = 3.26$, defined previously (2) as the cutoff point for the diagnosis of HH.

Confidence intervals were determined through binomial distribution. Data were analyzed and processed using the programs SPSS and MEDCALC.

The study was approved by the hospital's IRB. All subjects or guardians have signed the informed consent form.

RESULTS

Medians and P25-P75 ranges of Basal and Peak FAS and of $PBR\alpha$ of each group are depicted in table 2.

Median $PBR\alpha$ values of youngsters with CDGP is significantly higher than that of patients with IHH ($p < 0.001$). Overlapping results occur between $PBR\alpha$ values of 4.81 and 3.12, which are lower than the P25 of CDGP and higher than the P75 of IHH patients (Fig 1).

Median $PBR\alpha$ values of youngsters with CDGP is significantly greater than that of patients with CpHH ($p < 0.001$). Overlapping results occur between $PBR\alpha$ values of 3.26 and 3.12., which are close to the lowest value found in CDGP and the highest one found in CpHH (Fig. 1).

Median $PBR\alpha$ values of youngsters with CDGP is significantly higher than that of patients with CcHH ($p < 0.001$), with no overlapping results (Fig 1).

$PBR\alpha \leq 3.26$ establish the diagnosis of HH with 93.% sensitivity considering all 44 patients with HH; 76.9% considering only patients with IHH, and 100% when considering only patients with CcHH or only those with CpHH. Specificity is 94.4% considering CDGP boys as normal.

$PBR\alpha$ values ≤ 4.81 establish the diagnosis of HH in all groups, with 100% sensitivity and 88.9% specificity; values < 3.12 establish the diagnosis of HH with 100% specificity and 88.9%, 100% and 80% sensitivity, when patients with IHH, CcHH and CpHH, respectively, are considered.

Median $PBR\alpha$ values of patients with IHH is not statistically different from that of patients with CpHH, while both are significantly higher than the median $PBR\alpha$ of patients with CcHH ($p < 0.001$) (Fig.1).

Median Basal FAS values of normal pre-pubertal 6-8 yr.-old boys is significantly lower than that of normal pre-pubertal 9-13 yrs.-old boys ($p < 0.001$) (Table 2)

Median PBR α values of normal pre-pubertal 6-8 yr.-old boys, 9-13 yr.-old boys, of pubertal boys and of CDGP individuals are not statistically different. (Fig. 2)

DISCUSSION

In previous studies we have demonstrated that FAS and the index $PBR\alpha$ could distinguish states of transient physiological HH of normal boys from permanent definite HH of adult males (1, 2). In the first study, the control group was composed by 6-8 yr. old boys, in whom the H-P-G axis is suppressed (1), and in the second, 8-16 yr.-old pre-pubertal boys, in whom the H-P-G axis becomes active again(2).

We have shown that $PBR\alpha$ values ≤ 3.26 define HH with high sensitivity and specificity. In neither study, however, the performance of this test was assessed in CDGP, in isolated or in partial HH, conditions which pose more problems in clinical practice.

In this study, it was shown that $PBR\alpha$ values are significantly higher in pre-pubertal males with CDGP than in the total group of patients with HH. The fact that overlapping results occur only in the small interval of $PBR\alpha$ values between 4.81 and 3.12, which lies below the control (CDGP) P25 and above the diseased (HH) P75, confirms the relevance and clinical applicability of the test. It can be said that all patients with HH will have $PBR\alpha \leq 4.81$ (100% sensitivity and 88,9% specificity) and that no youngster with CDGP will have $PBR\alpha < 3.12$ (100% specificity and 88,6% sensitivity).

Using the cutoff point of 3.26, determined by the ROC curve in the previous study (2), HH is diagnosed by $PBR\alpha$ with 93.2% sensitivity and 94.4% specificity. These results are very similar to the ones found in the previous study, in which normal boys served as controls. The ability of $PBR\alpha$ in distinguishing CDGP from HH, as seen in this study, justifies its use as a test for the differential diagnosis of delayed puberty in males.

When HH patients were classified according to the concomitance of other hormone deficiency(ies) (Isolated or Combined) or according to the existence of initial testicular development (partial or complete), there are differences in performance using the same cutoff point. $PBR\alpha \leq 3.26$

diagnoses IHH with 76.9% sensitivity. Considering only patients with CcHH or only patients with CpHH, the test is 100% sensitive.

FAS is common to the pituitary gonadotropins and to TSH (4) and is synthesized both in the gonadotropes and thyrotropes (5, 6). Since many HH patients in this and in the previous studies were also TSH deficient and were receiving T₄ replacement, results could be biased by the assumption that FAS was decreased by TSH deficiency and/or suppression by T₄. It has been reported that serum FAS levels in patients with isolated gonadotropins deficiency, do not change after TSH suppression by T₄ (6) and that TRH causes equal increase in FAS in patients with HH and normal men (5).

In the present study, PBR α values of IHH patients - who had normal secretion of TSH and other pituitary hormones and were not taking T₄ - are significantly higher than those of patients with CcHH or with CpHH.

Despite this, PBR α still differentiates CDGP from IHH, being significantly higher in the former group, with overlapping results occurring only in the short interval between PBR α values 4.81- 3.12. The relevance and great clinical applicability of this index are maintained. It can be stated that, with 100% sensitivity and 88.9% specificity, IHH patients will have PBR α lower than 4,81 and, with 100% specificity and 76.9% sensitivity, no CDGP individual will have PBR α lower than 3.12.

As with other biological variables, there is an interval of doubtful diagnostic conclusions. The contribution given by PBR α is due to the fact that this interval of overlapping values is very short and distant from the P25-P75 ranges both of normal and IHH individuals. As this study does not address the ability of PBR α in identifying patients with partial isolated HH, possibly more numerous and difficult to detect, this group needs evaluation.

The relationship between LH, FSH and FAS secretions is demonstrated in several studies (7, 8, 9, 10, 11, 12) . FAS serum levels are low during childhood and increase from adolescence to adulthood

(8). In the present study it is shown that the median Basal FAS of pre-pubertal 9-13 yr. old boys is higher than that of the 6-8 yr.-old ones. On the other hand, Basal FAS does not differentiate normal boys from adults patients with HH (1). $PBR\alpha$, though, did not increase with increasing age and proved to be the same in normal pre-pubertal boys, pubertal youngsters and CDGP individuals, all states of intact H-P-G axis. $PBR\alpha$ is definitely lower in men with HH, contrary to Basal FAS.

The distinct capacity of $PBR\alpha$ to diagnose HH and the fact that it is not influenced by age, permit its use as a marker of the integrity of the H-P-G axis and introduce a new and powerful tool for the differential diagnosis of delayed puberty.

REFERENCES

- 1- Mainieri AS, Elnecave RH. Response of free alfa-subunit to GnRH distinguishes individuals with “functional” from those with permanent hypogonadotropic hypogonadism. *Horm.res.* 1998;50:212-216.
- 2- Mainieri AS, Elnecave RH. Hypogonadotropic hypogonadism is diagnosed by the peak/basal ratio of the free α -subunit (PBR α) submitted for publication. 2000.
- 3- Vieira JGH, Nishida SK, Lombardi MT, Abucham JZ, Kasamatsu TS. Monoclonal antibodies specific for the free alpha subunit of glycoprotein hormones and their use in the development of a sensitive immunofluorometric assay. *Braz. J. Med. Biol. Res* 1995;28 (6):633-636.
- 4- Reichlin S. Neuroendocrinology. In: Wilson JD.; Foster DW. ed. *Williams textbook of endocrinology*. 8.ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1992. p.135-220.
- 5- Winters SJ.; Troen P. Pituitary glycoprotein hormone α -subunit secretion after thyrotropin-releasing hormone stimulation in normal men and men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1990;70 (2):544-547.
- 6- Winters SJ.; Troen, P. α -subunit secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1988;66 (2):338-342.
- 7- Winters SJ, Troen P. α -subunit secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1988;66 (2):338-342.
- 8- Spratt DI, Chin WW, Ridgway EC, Ridgway EC, Crowley WF. Administration of low dose pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) to GnRH-deficient men regulates free α -subunit secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1986;62 (1):102-108.
- 9- Styne DM, Kaplan SL, Grumbach MM. Plasma glycoprotein hormone α -subunit in the neonate and in prepubertal and pubertal children: effects of luteinizing hormone-releasing hormone. *J. Clin.*

- Endocrinol. Metab 1980;50 (3):450-455.
- 10- Samuels MH, Veldhuis JD, Henry P, Ridgway EC. Pathophysiology of pulsatile and copulsatile release of thyroid-stimulating hormone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and α -subunit. J. Clin. Endocrinol. Metab 1990;71 (2):425-432.
- 11- Whitcomb RW, O'Dea LS, Finkelstein JS, Heavern DN, Crowley WF. Utility of Free Alpha-subunit as an Alternative Neuroendocrine Marker of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Stimulation of The Gonadotropin in the Human: Evidence from Normal and GnRH-Deficient Men. J-Clin-Endocrinol-Metab 1990;70 (6):1654-61.
- 12- Winters SJ, Troen P. Pulsatile secretion of immunoreactive α -subunit in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1985;60 (2):344-348.

TABLE 1. Characteristics of the samples of normal boys, youngsters with CDGP and men with HH, in specific subgroups .

| Groups | | Number | Age (years) | Testicular volume (ml) | Using T ₄ |
|--------------|--------------|--------|----------------|------------------------------|----------------------|
| NORMAL | pre-pubertal | 34 | 6 – 8 | < 4 | 0 |
| | pre-pubertal | 25 | 9 – 13 | < 4 | 0 |
| | pubertal | 25 | 11 – 17 | 5 – 12 | 0 |
| CDGP | CDGP | 18 | 13 – 16 | < 4 | 0 |
| HIPOGONADICS | IHH | 13 | ≥ 17 | < 4 | 0 |
| | CcHH | 21 | > 18 | < 4 | 19 |
| | CpHH | 10 | > 18 | 4 – 15 | 7 |

TABLE 2. Medians and P25-P75 range of serum Basal FAS and of PBR α values of each of the normal pre-pubertal boys groups, CDGP subjects and patients with HH.

| Groups | | Basal FAS (ng/L) | Basal FAS (IU/L) | PBR α |
|-------------|-----------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|
| NORMAL BOYS | ages 6-8 years | 58.5 (50.0-89.0) | 1.46 (1.25-2.23) | 7.2 (6.2-9.1) |
| | ages 9-13 years | 170.0 (95.0-197.0) | 4.25 (2.38-4.93) | 8.7 (6.6-11.3) |
| | pubertal | 113.0 (72.0-177.0) | 2.83 (1.80-4.43) | 8.1 (6.5-10.1) |
| CDGP | RCCDP | 167.6 (99.0-243.0) | 4.19 (2.48-6.08) | 7.5 (6.0-10.7) |
| HYPOGONADAL | IHH | 107.0 (77.0-115.0) | 2.68 (1.93-2.88) | 2.7 (2.1-3.0) |
| | CcHH | 80.0 (44.0-99.0) | 20,0 (1.10-2.48) | 1.6 (1.3-1.9) |
| | CpHH | 135.0 (90.0-213.0) | 3.38 (2.25-5.33) | 2.4 (2.1-3.1) |

Fig. 1 - Individual PBR α values of patients with IHH (○), CcHH (Δ), CpHH (\square) and individuals with CDGP (●). Lines represent the median (central), P25 (lower) and P75 (upper) range of each group.

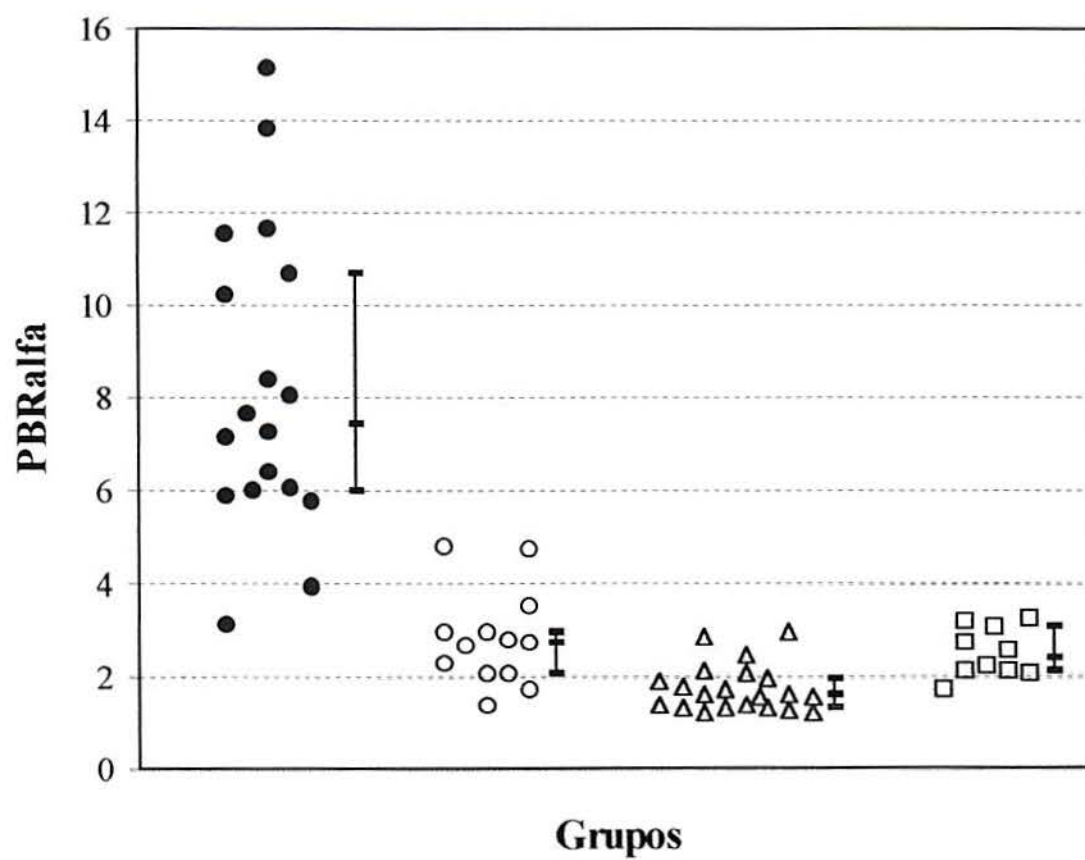


Fig 2 - Individual PBRa values of normal pre-pubertal 6-8 yr.-old (○), 9-13 yr.-old boys (△), youngsters with CDGP (●) and normal pubertal boys (▲). Lines represent the median (central), P25 (lower) and P75 (upper) range for each group.

