

Dynamic GnRH- and hCG-testing: establishment of new diagnostic reference levels

Bang AK, Nordkap L, Almstrup K, Priskorn L, Petersen JH, Rajpert-De Meyts E, Andersson AM, Juul A, Joergensen N.

Eur J Endocrinol. 2017 Jan 11. doi: 10.1530/EJE-16-0912 [Epub ahead of print]

RIASSUNTO

Objective: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and human Chorionic gonadotropin (hCG) stimulation-tests may be used to evaluate the pituitary and testicular capacity. Our aim was to evaluate changes in follicular-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and Testosterone after GnRH and hCG stimulation in healthy men, and assess the impact of six single nucleotide polymorphisms on the responses. **Design:** GnRH- and hCG-stimulation tests were performed on 77 healthy men, 18-40 years (reference group) at a specialized andrology referral center. The potential use of the tests was illustrated by results from 45 patients suspected of disordered hypothalamic-pituitary-gonadal axis. **Methods:** Baseline, stimulated, relative and absolute changes in serum FSH and LH were determined by ultrasensitive TRIFMA, and testosterone was determined by LC-MS/MS. **Results:** For the reference group LH and FSH increased almost 400% and 40% during GnRH testing, stimulated levels varied from 4.4-58.8 U/L and 0.2-11.8 U/L, FSH decreased in nine men. Testosterone increased approximately 110% (range 18.7-67.6 nmol/l) during hCG-testing. None of the polymorphisms had any major impact on the test results. Results from GnRH and hCG-tests in patients compared to the reference group showed that the stimulated level and absolute increase in LH showed superior identification of patients compared to the relative increase, and the absolute change in Testosterone was superior in identifying men with Leydig cell insufficiency, compared to the relative increase. **Conclusions:** We provide novel reference ranges for GnRH and hCG test in healthy men, which allows future diagnostic evaluation of hypothalamic-pituitary-gonadal disorders in men.

COMMENTO

I test da stimolo rappresentano uno dei più importanti strumenti nelle mani dell'endocrinologo. In ambito andrologico, il test da stimolo con il GnRH è utile per la valutazione delle disfunzioni ipotalamo-ipofisarie, mentre il test da stimolo con hCG trova specifica indicazione nei casi di ipotestosteronemia di verosimile origine testicolare. Nonostante l'indubbia utilità di questi esami diagnostici, la letteratura scientifica ha raramente approfondito l'importanza degli esatti valori di riferimento per ambedue i test: Tale aspetto appare oggi ancora più importante, alla luce delle recenti acquisizioni in merito al ruolo dei polimorfismi genici nel determinare la risposta biologica al fisiologico stimolo ormonale.

Il gruppo di Copenhagen, qui coordinato da Niels Jørgensen, ha analizzato i dati appartenenti a 45 pazienti affetti da diverse forme di ipogonadismo, contrapponendoli a quelli di un gruppo di controllo, al fine di identificare i diversi range di riferimento per entrambi i test.

Il gruppo di controllo consisteva di 80 soggetti sani, reclutati nell'ambito di uno studio parallelo sulla funzione testicolare, di cui 77 hanno completato il test al GnRH e 72 hanno effettuato entrambi i test.

L'analisi retrospettiva dei pazienti, tutti sottoposti fra 1996 e 2015 ad almeno uno dei test nell'ambito dell'inquadramento clinico, ha tenuto conto delle diverse patogenesi: 14 uomini sottoposti ad orchietomia per neoplasia e successiva terapia radiante sul didimo residuo, 6 uomini affetti da alterazioni morfologiche dell'ipofisi (5 tumori, una *empty sella*), 5 soggetti con diagnosi

di ipogonadismo ipogonadotropico (di cui 3 idiopatici e 2 sindromi di Kallmann), 9 con forme iatrogene di ipogonadismo e 11 uomini obesi con valori di testosterone medio-bassi.

Nel gruppo di controllo, la somministrazione di 100 µg di GnRH per via endovenosa ha portato ad un aumento relativo del 392% e del 40% rispettivamente per LH ed FSH entro 30 minuti; in 9 soggetti, curiosamente, i valori di FSH post-test sono risultati inferiori a quelli basali. Il genotipo non sembra essere associato a questo fenomeno, sebbene al contrario l'incremento post-GnRH dei valori di FSH sia risultato significativamente associato a specifiche variabili genetiche del gene *FSHR-29*, in particolare alle condizioni di omozigosi per l'allele A. I valori post-stimolo e l'incremento assoluto di LH sono risultati significativamente influenzati in senso negativo dall'età; questo dato non si è confermato per gli altri ormoni analizzati.

Il test con hCG è stato eseguito mediante somministrazione di 5000 UI seguito da prelievo ematico dopo 72 ore. Nel gruppo di controllo, i risultati di questo test hanno dimostrato come età ed indice di massa corporea siano negativamente correlati con i valori di testosterone basali, ma non con quelli dopo stimolo; i polimorfismi di *LHCGR*, inoltre, non sembrano avere effetti statisticamente rilevanti sui valori post-hCG.

Gli autori hanno quindi identificato il *cut-off* per i valori di normalità al 2.5° percentile per entrambi i test: i risultati sono elencati nella tabella seguente.

Test	Ormone in esame	Valore post-stimolo	Incremento assoluto	Incremento relativo
GnRH	LH	7.4 UI/L	3.3 UI/L	69%
hCG	Testosterone	23 nmol/L	7.5 nmol/L	35%

Tra i soggetti affetti dalle diverse forme di ipogonadismo, l'incremento relativo del valore di LH sopra il *cut-off* designato è stato osservato in tutti i pazienti sottoposti a test al GnRH, eccetto un singolo soggetto affetto da ipogonadismo ipogonadotropo idiopatico. L'aumento assoluto ha discriminato come non-responsivi due soggetti affetti da sindrome di Kallmann e due con patologie ipofisarie. La valutazione del solo valore ormonale post-stimolo ha invece riconosciuto come non-responsivi al test quattro dei sei pazienti affetti da anomalie ipofisarie e uno dei nove soggetti con ipogonadismo di verosimile origine iatrogena.

Fra i pazienti sottoposti al test con hCG, solo 8 su 39 soggetti hanno mostrato valori di testosterone post-stimolo superiori al 2.5° percentile. Tra i 14 pazienti con anamnesi di neoplasia testicolare, 13 hanno mostrato valori di testosterone post-hCG e incrementi assoluti inferiori ai *cut-off* proposti, mentre l'incremento relativo del testosterone ha definito come non-responsivi 8 soggetti. Per tre degli uomini con normale morfologia ipofisaria e 4 degli 8 uomini obesi, l'incremento assoluto della testosteronemia è risultato inferiore a quanto atteso.

Gli autori suggeriscono quindi di considerare "normale" la risposta al test con GnRH quando ad un valore di LH post-stimolo pari o superiore a 7.4 UI/L si associa un aumento assoluto pari o superiore a 3.3 UI/L. Similmente, la risposta al test con hCG può essere considerata fisiologica solo in caso di un aumento assoluto di almeno 7.5 nmol/L.

Lo studio di Jørgensen e colleghi contiene alcune debolezze, citate dagli stessi autori, tra cui la differenza fra i metodi analitici usati per i pazienti (immunoassay) e per i controlli (LC-MS/MS) e la mancanza di un metodo di correzione per l'età dei soggetti analizzati. Inoltre, la presenza di un gruppo di pazienti caratterizzato da notevole eterogeneità clinica e ridotta numerosità ha contribuito a rendere poco fattibile l'analisi dell'accuratezza diagnostica dei due test. Al contempo, lo studio ha il pregio di approfondire una tematica di chiara rilevanza clinica, fornendo utili indicazioni nell'identificazione di quella "area grigia" in cui è spesso difficile orientarsi. Inoltre, la tipizzazione genotipica ha consentito di escludere possibili interferenze dei polimorfismi genici sulla risposta ai test da stimolo.

Prof. Francesco Romanelli, Dott. Andrea Sansone

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Fisiopatologia Medica, Scienza dell'Alimentazione ed Endocrinologia

Sapienza – Università di Roma
Viale Regina Elena 324, 00161 Roma
email: francesco.romanelli@uniroma1.it