

Villanueva, Gisella Noelia

Evaluación de dos versiones comerciales de 17 α -Hidroxiprogesterona por radioinmunoensayo

2019

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Compartir Igual 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Villanueva, G. N. (2019) Evaluación de dos versiones comerciales de 17 α -Hidroxiprogesterona por radioinmunoensayo [tesis de grado Universidad Nacional Arturo Jauretche]

Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ <https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>

Evaluación de dos versiones comerciales de 17 α - Hidroxiprogesterona por radioinmunoensayo.

Alumna: Gisella Noelia Villanueva

Carrera: Bioquímica

Instituto de Salud

Directora: Andrea Tournier (Bioquímica. Jefa de Sala de Bioquímica especializada del laboratorio del Hospital de Niños “Sor María Ludovica”)

Fecha de entrega: 25/11/2019

Resumen

Introducción: La 17α -hidroxiprogesterona (17OHP) es uno de los metabolitos que permiten evaluar la función endocrinológica de las Glándulas Suprarrenales. Una de las alteraciones frecuentemente observadas en pediatría es la Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC), situación clínica resultante de deficiencias enzimáticas en la corteza suprarrenal. El déficit de 21α -Hidroxilasa es el más frecuente, y ocasiona el incremento de la 17OHP, dicha hormona se determina mediante el método de radioinmunoensayo (RIA). Un correcto resultado de 17OHP es imprescindible para llegar a un diagnóstico certero en el paciente.

Objetivos: Evaluar si las dos versiones del kit para la determinación de 17α -Hidroxiprogesterona por RIA, correlacionan entre sí y pueden considerarse concordantes.

Materiales y métodos: Se trabajó con 40 muestras de pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 20 días y 18 años, que concurrieron al hospital durante el periodo establecido octubre – noviembre de 2019 para el diagnóstico y control de tratamiento de hiperplasia, amenorreas y sospecha de pubertad precoz. Se realizó la determinación 17α -Hidroxiprogesterona por ambas versiones del kit de radioinmunoensayo. Se evaluó a través del test de Shapiro-Wilk si la distribución era normal y en función del resultado obtenido en el test, se utilizó el Chi-cuadrado de Pearson, el test Wilcoxon, el índice kappa de Cohen, el gráfico de Bland Altman, el coeficiente de correlación Rho de Spearman y la regresión de Passing Bablok.

Resultados: En los test de Shapiro de los conjuntos de valores obtenidos por ambos métodos la significancia asintótica = 0,00. En la prueba no paramétrica de Chi-cuadrado de Pearson la significancia obtenida mediante el software SPSS era: 0,410. El test de Wilcoxon el p valor = 0,014. En el análisis de correlación de la actual versión y de la nueva versión se observó que tenían coeficientes Rho de Spearman =1 y de 0,99 respectivamente. El índice kappa dio un valor = 0,26. En el gráfico de Bland Altman se visualizó que había una concordancia entre los métodos. En la regresión lineal se obtuvo un intervalo de confianza de la pendiente de 1 a 1,15 y de la ordenada: -0,08 a 0,68. El % de Sesgo calculado = 0,065%, el CV = 2,45 % y el error total =4,10 %. La media del método nuevo = 4,59 ng/ml y la media del método actual = 4,29 ng/ml. La mediana del método actual=0,8750 ng/ml y la mediana del método nuevo =1,05 ng/ml.

Conclusión

A partir el análisis estadístico realizado en esta tesis se puede concluir que existe una fuerte correlación y una buena concordancia entre los métodos. Además, el método nuevo tiene una precisión similar al método actual y es exacto ya que el % del sesgo obtenido es menor al error sistemático aceptable, por lo tanto, el método analizado es válido para hacer el diagnóstico de HSC.

Índice

1. Abreviatura.....	6
2. Introducción general.....	8
3. Introducción específica.....	9
3.1. Embriogenia y anatomía.....	9
3.1.1. Genes que codifican para proteínas asociadas a embriogénesis suprarrenal.....	10
3.2 Esteroidogénesis	11
3.2.1 Síntesis de cortisol.....	14
3.3 Regulación de la secreción	14
3.3.1 Control neuroendocrino	16
3.3.2 Secreción de mineralocorticoides	17
3.4 Circulación, transporte y metabolismo de los esteroides suprarrenales	17
3.4.1. Alteraciones en la depuración y el metabolismo	18
3.4.2. El exceso de cortisol genera hipertensión	18
3.4.3 Conversión y excreción de andrógenos suprarrenales.....	19
3.5 Efectos de las hormonas esteroideas	19
3.5.1 Glucocorticoides	19
3.5.2 La acción de los glucocorticoides sobre el metabolismo.....	19
3.5.3 Efectos que generan los glucocorticoides en diferentes tejidos	20
3.6 Hiperplasia Suprarrenal Congénita	22
3.6.1 Déficit de 21 α -hidroxilasa	23
3.6.2 Déficit de 11 β – hidroxilasa.....	25
3.6.3 Déficit de 17 α - hidroxilasa	27
3.6.4 Déficit de 3 β – hidroxisteroide deshidrogenasa.....	28

3.6.5. Déficit de la StAR.....	29
3.6.6. Déficit de cortisona reductasa.....	30
3.7 Pesquisa de HSC	30
3.8. RIA.....	31
3.9 Distribución normal y pruebas no paramétricas	31
3.9.1 Test de Shapiro-Wilk.....	32
3.9.2. Método no paramétrico	32
3.9.3. Test de Wilcoxon.....	33
3.9.4 Concordancia, correlación y regresión de Passing Bablok.....	33
4. Objetivos.....	34
4.1. Objetivos específicos.....	35
5.Materiales y métodos.....	35
6. Resultados	37
7. Discusión	45
8.Conclusión	46
9. Bibliografía.....	47

1. Abreviaturas

- ACTH : Hormona adrenocorticotropa
- ARP : Actividad de la renina plasmática
- CBG : Globulina transportadora de corticosteroide
- CRH : Hormona liberadora de corticosteroide
- CYP11B1 : Gen que codifica para la enzima 11 beta- hidroxilasa
- CYP11B2 : gen que codifica para la enzima Aldosterona sintasa
- DAX1: Producto del gen de inversión de sexo- hipoplasia suprarrenal sensible a dosificación
- CYP 21 A2 : Gen que codifica para la enzima 21-hidroxilasa
- CYP 21A 1 P : Pseudogen duplicado del gen CY21 A2
- DHEA : Dehidroepiandrosterona
- DNA : Ácido desoxirribonucleico
- DOC : Desoxicorticosterona
- GCh : Gonadotropina coriónica humana
- GH : Hormona de crecimiento
- GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina
- HDL : Lipoproteína de alta densidad
- HLA : Antígeno leucocitario humano
- Hsp90 : Proteína de shock térmico
- IGF-1 : Factor de crecimiento insulino similar tipo 1
- IL – 1 : Interleuquina
- IAR : Índice aldosterona / renina
- LDL : Lipoproteína de baja densidad
- LH : Hormona luteinizante
- HPLC : Cromatografía líquida de alto rendimiento
- 17OHP : 17-hidroxiprogesterona
- POMC : Proopiomelanocortina
- P450aldo : Aldosterona sintasa

- P450c11: 11 beta – Hidroxilasa
- P450scc: Colesterol – 20, 22-desmolasa
- PTH : Hormona paratiroidea
- RIA : Radioinmunoensayo
- SF-1 : Factor esteroideogénico- 1 a
- SHBG : Globulina de unión a hormona sexual
- StAR : Proteína reguladora aguda esteroideogénica
- T3 : Triyodotirosina
- T4 : Tiroxina
- TRH : Hormona liberadora de tirotrópina
- TSH : Hormona estimulante de tiroides (tirotrópina)

2. Introducción general

La 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP) es uno de los metabolitos que permiten evaluar la función endocrinológica de las Glándulas Suprarrenales. Anatómicamente dichas glándulas están formadas por una corteza y una médula rodeadas por una cápsula de tejido conectivo. La corteza se divide en la zona glomerular que produce los mineralocorticoides (aldosterona), la zona fascicular que produce los glucocorticoides (cortisol) y la zona reticular sintetiza los andrógenos. La médula sintetiza las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). La producción de glucocorticoides y de andrógenos está regulada por el eje hipotálamo- hipófisis – glándula adrenal. El hipotálamo secreta la CRH (hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa) la cual estimula a la hipófisis para que produzca la ACTH (hormona adrenocorticotropa) que actúa sobre la zona fascicular y reticular de la corteza adrenal.

Una de las alteraciones frecuentemente observadas en pediatría es la Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC), la cual comprende un grupo de enfermedades hereditarias autosómicas recesivas, causadas por un defecto en alguna de las enzimas necesarias para la biosíntesis de glucocorticoides y mineralocorticoides. Como consecuencia se produce un déficit de la producción de cortisol, en algunos casos de aldosterona, y una elevación de esteroides previos al bloqueo enzimático. La 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP) es el marcador bioquímico más utilizado para el diagnóstico y monitoreo de la HSC. En el 95% de los casos es producida por deficiencia de la enzima 21- hidroxilasa citocromo P450C21 (21-OHD), la cual compromete la biosíntesis del cortisol, provocando la elevación anormal de su sustrato esteroideo 17OHP con producción incrementada de andrógenos adrenales. El espectro clínico ocasionado por deficiencia de 21-OHD varía desde formas asintomáticas a formas graves con deshidratación, alteraciones electrolíticas y genitales ambiguos, dependiendo del grado de déficit enzimático. Se presenta en tres formas clínicas: perdedora de sal y virilizante simple, ambas descritas como formas clásicas (HSC-C) diagnosticadas por lo general en las primeras semanas de vida, y una forma de comienzo tardío descrita como forma no clásica (HSC-NC). La incidencia global de la forma clásica es de 1:10.000 a 1:15.000, y la incidencia de la forma no clásica o tardía del mismo déficit es de 1:1000.

En la presentación clásica perdedora de sal las manifestaciones clínicas son hipotensión, deshidratación, hipertrofia de clítoris, fenotipo intersexo, hipertricosis pubertad precoz, hiperpigmentación de genitales y en la virilizante simple se produce la virilización de fetos femeninos. La presentación no clásica la sintomatología que genera son alteraciones menstruales, infertilidad, hipertricosis e hirsutismo.

La 17OHP se determina mediante el método de RIA (radioinmunoensayo), su diseño es competitivo, en el que se produce una reacción antígeno-anticuerpo en donde compiten la hormona fría (en la muestra) con la hormona marcada con un radioisótopo. La concentración de hormona fría puede ser estimada utilizando una curva de calibración realizada con estándares de concentraciones conocidas.

Existe la actual versión de RIA de 17OHP y la nueva versión. La diferencia entre ambas es que el método nuevo tiene un anticuerpo policlonal de conejo que reemplaza al anticuerpo de conejo actual

Un correcto resultado de 17OHP es imprescindible para llegar a un diagnóstico certero del paciente; evitándose pérdidas salinas, errores en la asignación de sexo, hipoglucemia y otras manifestaciones clínicas. Es por lo tanto importante determinar si ambas versiones arrojan resultados equivalentes

3. Introducción específica

3.1. Embriogenia y anatomía

Las glándulas suprarrenales humanas son dos estructuras piramidales localizadas en el polo superior de ambos riñones. Constan de dos tejidos endocrinos bien delimitados con funciones y orígenes embriológicos diferentes, una corteza externa y una médula interna, ambas recubiertas por una cápsula de tejido conectivo.

“La corteza suprarrenal deriva de las células mesenquimales unidas al revestimiento de la cavidad celómica adyacente a la cresta urogenital” (Williams. (2017). *Tratado de endocrinología* .13° ed. Elsevier). La glándula adrenal se visualiza entre la sexta y la

octava semana de gestación. Desde la vida fetal hasta los 12 meses postparto se distingue una zona interna (zona fetal) y una zona externa definitiva que se transforma en la glándula suprarrenal adulta. Al nacimiento ocurre la regresión progresiva de la zona fetal siendo sustituida a los 6 meses por la zona definitiva que prolifera dando origen a una zona interna fasciculada y una externa glomerular. La capa más interna, zona reticular, se evidencia luego del primer año de vida.

Cercana a la quinta semana de gestación las células primitivas de la cresta neural se trasladan a la región torácica y se genera la cadena simpática posterior. En la sexta semana de gestación las células primitivas se desplazan hacia la corteza suprarrenal para formar la médula suprarrenal.

La médula está compuesta por células cromafines o feocromocitos dispuestas en pequeños grupos o cordones. Los cromafines sintetizan la noradrenalina y la adrenalina. Las células de la médula están inervadas por neuronas del sistema nervioso simpático, que hacen sinapsis al secretar acetilcolina y encefalinas.

La glándula está perfundida por arteriolas y capilares de la frénica inferior, de la aorta y de las arterias renales e intercostales. Estas arterias se ramifican y forman un plexo arteriolar subscapular, del cual divergen capilares radiales e irrigan la corteza y la médula. En la zona reticular se forma un plexo sinusoidal denso que libera la sangre hacia a una vena central. La vena suprarrenal derecha drena a la vena cava inferior y la vena suprarrenal izquierda converge en la vena renal izquierda.

3.1.1 Genes que codifican para proteínas asociadas a embriogénesis suprarrenal

Los genes que codifican para los factores de transcripción (SF-1y DAX1) son necesarios para el desarrollo y la diferenciación de la glándula.

El factor de transcripción SF-1 interviene en la determinación del sexo al regular la actividad de los genes relacionados con las gónadas y las glándulas. Está codificado por el gen NR5A1, el cual pertenece a la subfamilia de receptores nucleares, localizado en el brazo largo del cromosoma 9 en la posición 33.3.

SF-1 se expresa en tejidos esteroideogénicos adultos, en células adrenocorticales, células de Leydig, células de la teca y granulosa ovárica. Este factor de transcripción contribuye en la diferenciación de los testículos fetales.

La diferenciación sexual de los ovarios es estimulada por la disminución en la transcripción de SF-1 y las proteínas.

La receptora nuclear DAX1 está codificada por el gen NROB1, este gen está en el brazo corto del cromosoma X en las posiciones 21.3 y 21.2. La proteína receptora nuclear influye como un controlador negativo de receptores nucleares, es antagónica al SRY al actuar de manera similar a un gen anti- testículos. DAX1 regula la función de genes en las células de las glándulas suprarrenales, la glándula pituitaria, el hipotálamo, de los testículos y de los ovarios en el desarrollo embrionario. Además, controla la síntesis de hormonas en los órganos mencionados.

3.2 Esteroidogénesis

Las hormonas adrenales (el cortisol, los andrógenos y la aldosterona) derivan del colesterol que tiene la estructura química del ciclopentanoperhidrofenantreno. “El 80% aproximadamente del colesterol utilizado para la esteroidogénesis procede de las lipoproteínas plasmáticas y las células suprarrenales poseen receptores de membrana para la LDL que se internaliza y, a nivel de los lisosomas, los ésteres del colesterol son hidrolizados, liberándose colesterol que es utilizado como sustrato para la esteroidogénesis. El 20% restante del colesterol utilizado para la esteroidogénesis procede, en condiciones normales, de la biosíntesis intracelular del colesterol a partir de acetilCoA. En las células suprarrenales la ACTH aumenta el número de receptores para la LDL, así como las actividades de la enzima colesterol estearasa (ACAT) que libera colesterol libre a partir de sus ésteres, aumentando, por lo tanto, la cantidad de colesterol libre intracelular” (Brandan Nora C, Llanos Isabel Cristina, Horak Francisco A, Tannuri Hugo O, Rodríguez Andrea N. (2014) . *Hormonas de la corteza adrenal*. Recuperado el 24 de diciembre de <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/CarreraMedicina/BIOQUIMICA/CORTEZA%20SUPRARRENAL%20%202014.pdf>)

“La conversión del colesterol en los diversos esteroides involucra la acción de una serie de enzimas pertenecientes, la mayoría de ellos, a la familia de las proteínas citocrómicas p450. Estas proteínas son oxidasas captadoras de hierro. La amplia familia de proteínas citocrómicas p450 consiste en más de 10 familias de proteínas codificadas por más de 100 genes y pseudogenes”.

(Brandan Nora C, Llanos Isabel Cristina, Horak Francisco A, Tannuri Hugo O, Rodríguez Andrea N. (2014) . *Hormonas de la corteza adrenal*. Recuperado el 24 de diciembre de <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/CarreraMedicina/BIOQUIMICA/CORTEZA%20SUPRARRENAL%20%202014.pdf>)

El gen CYP11A está localizado en el cromosoma 15, codifica para P450scc (enzima), la función de la proteína es realizar la escisión de la cadena lateral del colesterol.

El gen CYP11B1 se ubica en el cromosoma 8, codifica para P450c11 que interviene en la 11 beta – hidroxilación en la zona reticular y fascicular de la corteza de la glándula adrenal. Está reacción transforma el 11 – desoxicortisol en cortisol y convierte la 11 – desoxicorticosterona (11- DOC) en corticosterona.

EL CYP11B2, es un gen situado en el cromosoma 8, el cual codifica para la enzima P450aldo que participa de la 11 beta- hidroxilación, la 18- hidroxilación y la 18- oxidación para transformar 11-DOC en corticosterona.

El gen CY17 que está en el cromosoma 10, codifica para la proteína P450c21 que interfiere en la 21-hidroxilacion de la progesterona y de la 17- Hidroxiprogesterona.

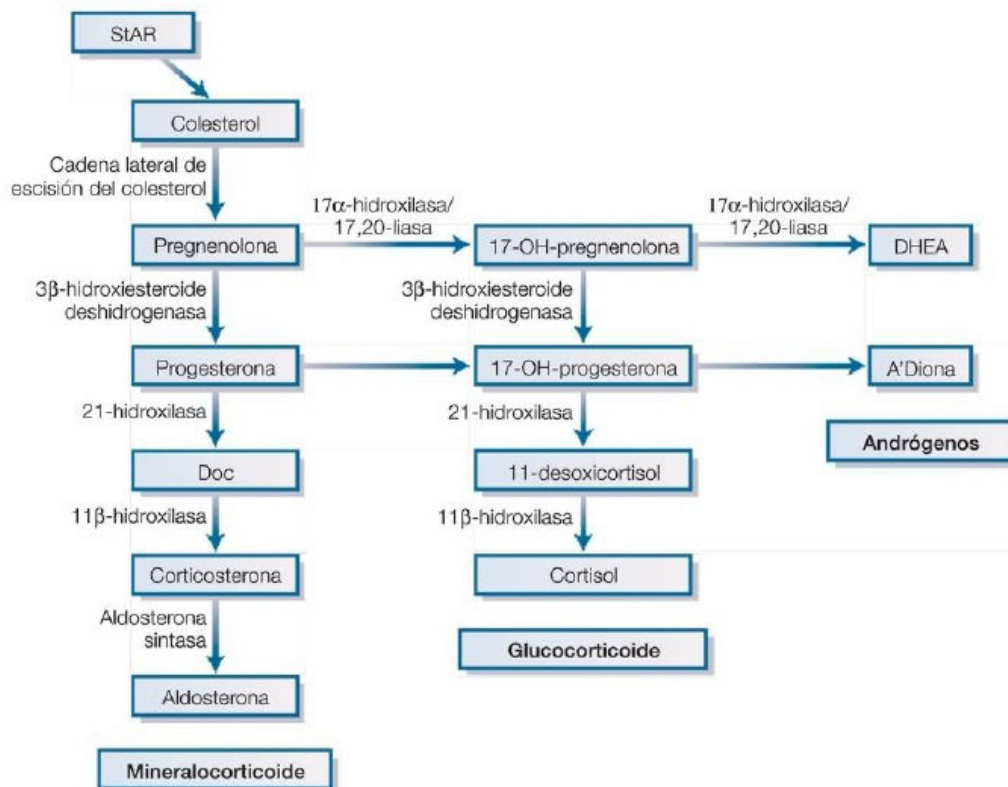
Nombre de la enzima	Gen	Cromosoma
Escisión de la cadena lateral del colesterol (SCC) (desmolasa)	<i>CYP11A1</i>	15q23-q24
3β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3β-HSD) (isozima de tipo II)	<i>HSD3B2</i>	1p13.1
17α-hidroxilasa/17,20-liasa	<i>CYP17</i>	10q24.3
21-hidroxilasa	<i>CYP21A2</i>	6p21.3
11β-hidroxilasa	<i>CYP11B1</i>	8q24.3
Aldosterona sintasa	<i>CYP11B2</i>	8q24.3

Tabla 3.2.1. Nomenclatura de las enzimas esteroideogénica suprarrenales, de sus genes y localización cromosómica. Williams. (2017). *Tratado de endocrinología* .13° ed. Elsevier.

En la corteza suprarrenal las proteínas p450 están localizadas en la mitocondria o en el retículo endoplásmico (microsomales): las mitocondriales requieren una proteína sulfatoférrica y una flavoproteína como transportadores intermedios de electrones, mientras que las microsomales sólo requieren una flavoproteína. Todas estas proteínas P450 requieren NADPH como donante de electrones. “El paso limitante de la velocidad de la esteroidogénesis suprarrenal es la entrada de colesterol a través de las membranas mitocondriales externa e interna” (Brandan Nora C, Llanos Isabel Cristina, Horak Francisco A, Tannuri Hugo O, Rodríguez Andrea N. (2014). *Hormonas de la corteza adrenal*. Recuperado el 24 de diciembre de <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/CarreraMedicina/BIOQUIMICA/CORTEZA%20SUPRARRENAL%20%202014.pdf>)

En el proceso generado por 11 beta – hidroxilasa necesita un sistema de transferencia de electrones que lo suministra la adrenodotoxina reductasa y adrenodoxina. Las reacciones siguientes que se producen dependen de la zona de la corteza suprarrenal.

Figura 3.2.2. Esteroidogénesis suprarrenal después de la captación de colesterol mediada por la proteína



reguladora aguda StAR. Williams. (2017). Tratado de endocrinología .13° ed. Elsevier.

3.2.1 Síntesis de cortisol.

La pregnenolona sale de la membrana interna de la mitocondria y se transporta al retículo endoplásmico liso. En la pregnenolona se genera la 17alfa- hidroxilación a través de 17 alfa- hidroxilasa y se convierte en 17 alfa – Hidroxiprogesterona, posteriormente a la transformación del doble enlace 5,6 en un doble enlace 4,5 mediante el complejo enzimático 3beta – hidroxisteroide deshidrogenasa. Además, en la zona fascicular y reticular se puede convertir la pregnenolona en progesterona a través de la isoenzima de tipo 2 de la 3 beta – hidroxisteroide deshidrogenasa y está última hormona en 17 alfa- Hidroxiprogesterona por medio de la acción de la 17 alfa- hidroxilasa. Después la enzima 21 – hidroxilasa realiza la 21- hidroxilación de la 17 alfa- Hidroxiprogesterona para convertirlo en 11- desoxicortisol, el cual es hidroxilado a través de 11beta -hidroxilasa para sintetizar cortisol. Además, se genera DOC, 18-hidroxidesoxicorticosterona y corticosterona en la zona fascicular y reticular.

3.3 Regulación de la secreción

La producción de cortisol y de andrógenos es regulado por el sistema CRH-ACTH (eje Hipotálamo -Hipófisis -Glándula Suprarrenal). La ACTH es secretada por la hipófisis anterior en respuesta al estímulo de CRH y otros neurotransmisores de origen hipotalámico. Un aspecto importante de la secreción de CRH y ACTH es el control de retroalimentación negativa ejercido por los mismos glucocorticoides.

La ACTH humana, o corticotropina, un péptido de 39 aminoácidos, se sintetiza como parte de una proteína precursora de mayor tamaño, la proopiomelanocortina (POMC), y se libera a partir de su precursor por medio de la separación proteolítica de residuos dibásicos, por acción de la endoproteasa serínica. Otros péptidos de importancia biológica, entre ellos las endorfinas, las lipotropinas y la hormona estimulante de melanocitos (MSH), se producen por el mecanismo proteolítico de la misma POMC precursora.

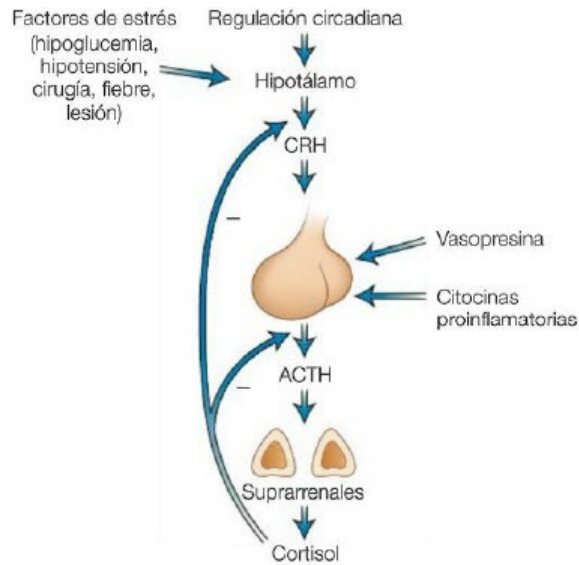


Figura 3.3.1. Regulación normal de la secreción suprarrenal de glucocorticoides. Williams. (2017). *Tratado de endocrinología*. 13° ed. Elsevier.

La ACTH actúa uniéndose a receptores de la membrana plasmática, esto produce la activación de la adenilil ciclasa, que a partir de ATP genera AMPc, este activa a las fosfoproteínas quinasas y a la StAR. La ACTH induce un incremento de la actividad del colesterol esterasas originando un aumento de la síntesis de colesterol y de la captación LDL en la corteza suprarrenal.

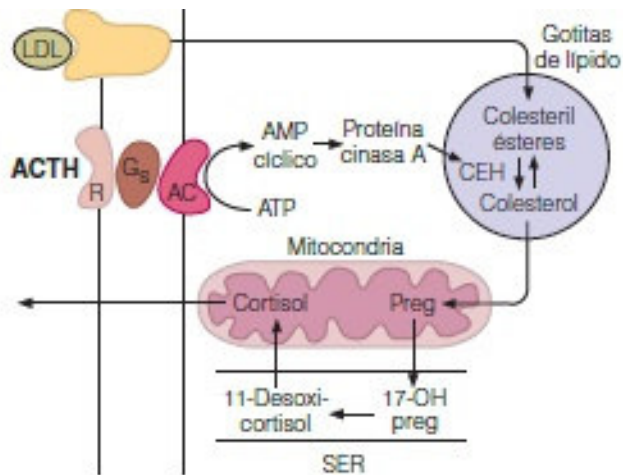


Figura 3.3.2 Mecanismo de acción de la ACTH sobre las células secretoras de cortisol en las dos zonas internas de la corteza suprarrenal. David G. Gardner & Dolores Shoback (2012). *Endocrinología básica y clínica*. (9° ed.). Mac Graw Hill.

“Existen dos tipos de efectos del ACTH sobre la esteroidogénesis: los agudos, producidos en pocos minutos y los crónicos, que requieren horas o días. El efecto agudo del ACTH consiste en aumentar la transformación de colesterol a pregnenolona, la primera etapa limitante en la esteroidogénesis: esto se consigue activando la enzima P-450-scc.” (Brandan Nora C, Llanos Isabel Cristina, Horak Francisco A, Tannuri Hugo O, Rodríguez Andrea N. (2014) . *Hormonas de la corteza adrenal*. Recuperado el 24 de diciembre de <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/CarreraMedicina/BIOQUIMICA/CORTEZA%20SUPRARRENAL%20%202014.pdf>)

Los efectos crónicos del ACTH consiste en aumentar la síntesis de la mayoría de enzimas de la esteroidogénesis y en efecto sobre la síntesis de proteína y DNA de las suprarrenales, provocando hipertrofia e hiperplasia.

3.3.1 Control neuroendocrino

“Hay tres mecanismos de regulación neuroendocrinos: el primero es la secreción episódica y el ritmo circadiano de ACTH, el segundo es la capacidad de respuesta al estrés del eje hipotálamo- hipófisis- suprarrenal y el tercer es inhibición por retroacción por cortisol de la secreción de ACTH” (David G. Gardner & Dolores Shoback (2012) . *Endocrinología básica y clínica*. (9º ed.). Mac Graw Hill)

En la secreción y el ritmo circadiano de ACTH, hay descenso en la producción de cortisol al final de la tarde y disminuye más en el inicio del sueño. En la tercera, quinta, sexta y octava hora del sueño incrementa la liberación de cortisol por la zona fascicular de la corteza adrenal. Al despertar la persona comienza a disminuir el cortisol en el plasma. La secreción de cortisol baja durante el día y además puede incrementar la síntesis de la hormona con el ejercicio e ingesta de las comidas.

En la respuesta al estrés, se incrementa la estimulación al eje hipotálamo—hipófisis - glándula adrenal aumentando la generación de ACTH y de cortisol. Esto se produce en situaciones de fiebre, cirugía, quemaduras, hipoglucemia, hipotensión, esfuerzo, estrés psicológico y en la depresión.

El feedback negativo es producido por los glucocorticoides, los cuales ocasionan la supresión de la transcripción del gen POMC, de la producción y de la liberación de CRH. Además, se produce una disminución de cortisol y de andrógenos por la retroalimentación negativa anteriormente mencionada.

3.3.2 Secreción de mineralocorticoides

“La aldosterona, se secreta en la zona glomerulosa, está regulada principalmente por la angiotensina II, el potasio y la ACTH. La secreción de aldosterona y sus metabolitos intermedios 18-hidroxilados está restringida a la zona glomerulosa debido a la expresión zonal específica de CYP11B2: aldosterona sintasa”(David G. Gardner & Dolores Shoback (2012) . *Endocrinología básica y clínica*. (9° ed.). Mac Graw Hill).

La angiotensina II (Ang II) constituye el principal péptido del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). Sus acciones locales son la vasoconstricción y la estimulación de la liberación de aldosterona.

El aparato yuxtaglomerular (pertenece al SRAA) secreta la renina cuando disminuye la carga de sodio, potasio en los túbulos contorneados distal y la presión de perfusión. La renina es transportada al hígado, en donde convierte el angiotensinógeno en angiotensina I, la angiotensina I se traslada al pulmón donde una ECA (enzima convertidora de angiotensina) la transforma en angiotensina II. La angiotensina II produce la vasoconstricción elevando la presión arterial y en la zona glomerular de corteza adrenal incrementa la transcripción del gen CYP11B2 aumentando la síntesis de aldosterona.

3.4 Circulación, transporte y metabolismo de los esteroides suprarrenales

“ El cortisol circula unido a una proteína específica (alta afinidad y especificidad), α_2 -globulina glucosilada llamada transcortina o CBG (*CorticosteroidBindingGlobulin*). El 95 % del cortisol sanguíneo circula unido a proteínas, el 70 % a la transcortina y el resto, con menor afinidad, a la albúmina y a los hematíes. El 5 y el 8 % del cortisol está libre para sus acciones biológicas. En condiciones normales, la vida media del cortisol es de 60-80 minutos, y su metabolismo, así como el de todos los demás esteroides, tiene lugar principalmente en el hígado. En este, el cortisol es rápidamente catabolizado a tetrahydrocortisol y tetrahydrocortisona principalmente, siendo estos después conjugados

con el ácido glucurónico y en menor proporción son sulfatados, para formar productos hidrosolubles que vuelven a la circulación por la vena hepática o son excretados a la luz intestinal con la bilis. Además, en el riñón tiene lugar el metabolismo de cortisol a cortisona. El 90 % del cortisol, sus metabolitos y conjugados, aproximadamente, son excretados por el riñón en la orina, y el resto es eliminado por vía intestinal.” ((Brandan Nora C, Llanos Isabel Cristina, Horak Francisco A, Tannuri Hugo O, Rodríguez Andrea N. (2014) . *Hormonas de la corteza adrenal*. Recuperado el 24 de diciembre de <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/CarreraMedicina/BIOQUIMICA/CORTEZA%20SUPRARRENAL%20%202014.pdf>)

Los dos principales precursores de andrógenos de origen suprarrenal son la androstendiona y la DHEA. Sólo son activos por metabolismo periférico y transformación en testosterona (T) o dihidrotestosterona (DHT). Androstendiona y DHEA se unen con mayor afinidad a la proteína de transporte de los esteroides sexuales SHBG que a la CBG. Estos esteroides son metabolizados en parte en el hígado. Pero una proporción importante de su metabolismo tiene lugar en las gónadas, la piel y el tejido adiposo. La androstendiona puede ser transformada de forma reversible en T por el enzima 17-cetorreductasa y de forma irreversible en estrona por el enzima aromatasa (P-450-AROM).

El principal mineralocorticoide circulante en sangre periférica es la aldosterona, siendo menos activos, aunque su concentración sea superior, la DOC y la corticosterona. La aldosterona se une a la CBG con el 10 % de afinidad, con respecto a la del cortisol, mientras que la corticosterona y la DOC se unen a la CBG con afinidades respectivas del 100 y del 50 %. La vida media de la aldosterona es aproximadamente de 45 minutos. El hígado metaboliza prácticamente toda la aldosterona que llega a la circulación enterohepática, siendo los dos principales metabolitos excretados por la orina, la tetrahidroaldosterona y el glucurónido de aldosterona

3.4.1. Alteraciones en la depuración y el metabolismo

El metabolismo de los glucocorticoides se encuentra reducido en los bebés, en personas mayores, en hipotiroidismo, inanición, anorexia nerviosa, embarazo, terapia con estrógenos, enfermedad del hígado y en enfermedad crónica grave. Está incrementada la

depuración en el hipertiroidismo y por drogas (barbitúricos, fenitoína, mitotano, aminoglucetimidina y rifampicina).

3.4.2. El exceso de cortisol genera hipertensión

El cortisol cuando se produce de manera exacerbada en la zona fascicular, se une al receptor de mineralocorticoides produciendo manifestaciones clínicas como expansión del volumen, hipertensión e hipotasemia ya que el evento post receptor origina un aumento de la reabsorción de sodio, de agua y de la secreción de potasio.

En concentraciones normales de cortisol, la enzima 11 beta -HSD, transforma los glucocorticoides en cortisona que no tiene actividad.

3.5 Efectos de las hormonas esteroideas

3.5.1 Glucocorticoides

El cortisol se une a sus receptores, las hsp90 se separan y los complejos de hormona-receptor ingresan al núcleo. Este complejo actúa sobre determinadas zonas en el ADN y el primer mecanismo de acción que se dispara es la regulación de la transcripción. El complejo receptor/glucocorticoide puede llevar a cabo dos procesos diferentes: si se transloca al núcleo, el complejo activará la expresión de proteínas antiinflamatorias; si se mantiene en el citoplasma, el complejo reprimirá la expresión de proteínas proinflamatorias (impidiendo la translocación de otros factores de transcripción del citosol al núcleo).

3.5.2 La acción de los glucocorticoides sobre el metabolismo.

El cortisol aumenta la producción de lactato en el músculo, estimula la lipólisis en el tejido adiposo, en el hígado incrementa la glucemia a través de la gluconeogénesis y aumenta la glucogenogénesis.

Además, incrementa la concentración de colesterol, de triglicéridos y produce un descenso en la cantidad de colesterol HDL.

También el cortisol impide que el músculo y tejido adiposo capten glucosa. Además, el páncreas secreta más insulina cuando está aumentada la cantidad de los glucocorticoides y también se produce una resistencia a la insulina.

3.5.3 Efectos que generan los glucocorticoides en diferentes tejidos

Los glucocorticoides estimulan la adipogénesis (síntesis adipocitos) mediante la activación de genes de diferenciación de adipocitos.

En el músculo esquelético, el cortisol genera un incremento de la proteólisis, una disminución de la síntesis de proteínas, en la captación y en el metabolismo de la glucosa.

Las elevadas concentraciones de cortisol inhiben a los fibroblastos, reduce el crecimiento de células epidérmicas, síntesis de DNA, disminuyendo el colágeno y el tejido conectivo. Las alteraciones que origina son adelgazamiento de la piel, susceptibilidad a los moretones, ser más propenso a tener estrías y la cicatrización anormal en las lesiones.

Los glucocorticoides suprimen la osteogénesis (formación de la masa ósea) ocasionando osteopenia (disminución de la densidad mineral ósea). Además estimula la osteólisis (resorción ósea) a través del incremento de la actividad de la PTH y de la 1,25-dihidroxicolecalciferol.

El cortisol disminuye el calcio en el plasma y esta situación hace que aumente la secreción de PTH. La 1,25 (OH)₂ D puede estar cantidades normales o aumentadas en concentraciones incrementadas de glucocorticoides.

El cortisol en exceso ocasiona hipercalciuria (calcio elevado en orina), disminuye la reabsorción de fosfatos en el riñón, origina fosfaturia y disminución en la cantidad de fósforo en la sangre. También regula la concentración de calcio en sangre aumentando la degradación del hueso y en consecuencia desencadena una osteoporosis.

Los glucocorticoides suprimen la síntesis de GH y de IGF-1 ocasionando una disminución en la velocidad del crecimiento.

El exceso de glucocorticoides genera hipertensión arterial debido a que incrementa la sensibilidad de las catecolaminas y de la angiotensina 2 (produce vasoconstricción).

La producción de angiotensinógeno está incrementada por el evento post receptor que se genera al unirse el glucocorticoide al receptor de mineralocorticoides y causa hipernatremia (aumento de sodio en plasma) y pérdida de potasio.

Los glucocorticoides exógenos suprimen la respuesta inmunológica, disminuye del torrente sanguíneo la cantidad de linfocitos, monocitos, eosinófilos en la sangre ya que aumenta el transporte de estas células hacia el bazo, ganglio linfático y médula ósea.

De la misma manera el cortisol reduce el traslado de los leucocitos hacia el lugar del daño, las altas dosis de glucocorticoides ocasionan en la persona que sea más propensa a las infecciones por el efecto antiinflamatorio que es más potente a altas concentraciones. Además reduce la síntesis de linfocitos y disminuye sus actividades.

También inhibe la síntesis de citoquinas producida por los linfocitos ya que inactiva a NF-kB (estimula la transcripción de los genes).

La inducción de las proteínas lipocortinas o anexinas bloquea la actividad de la fosfolipasa A₂, generando una disminución en la producción de prostaglandinas. También modifica la secreción de interleucina IL1, la síntesis de anticuerpos y las actividades de los linfocitos.

El cortisol aumenta el gasto cardíaco y los efectos de la vasoconstricción. El control de la expresión de los receptores adrenérgicos es llevado a cabo por los glucocorticoides.

También concentraciones incrementadas de cortisol producen alteraciones clínicas como depresión, euforia, psicosis, trastorno bipolar, alteraciones de las funciones cognitivas, incremento del apetito, disminución del lívido e insomnio. En el globo ocular incrementan la síntesis de humor acuoso y en retículo trabecular se acumula matriz aumentando la presión en el ojo. Además, bajas concentraciones de glucocorticoides causan apatía, depresión, irritabilidad, que el paciente se haga solitario, disminución del apetito e incrementa los sentidos del gusto y el olfato.

El cortisol suprime la producción de TSH y su secreción. Además, disminuye la respuesta de la TSH a la TRH. La cantidad de T3 total y de T3 libre podría estar disminuida debido al incremento de los glucocorticoides que reduce la transformación de T4 a T3 e incrementa la producción de T3 reversa.

La hormona producida por la zona fascicular de la corteza suprarrenal en los hombres genera un descenso de la respuesta en la hipófisis a la GnRH, disminuyendo la producción de gonatropinas y de testosterona. Asimismo, inhiben la respuesta de la LH a la GnRH, lo que ocasiona una inhibición de los estrógenos y progesterona, con supresión de la ovulación y el cese de las menstruaciones.

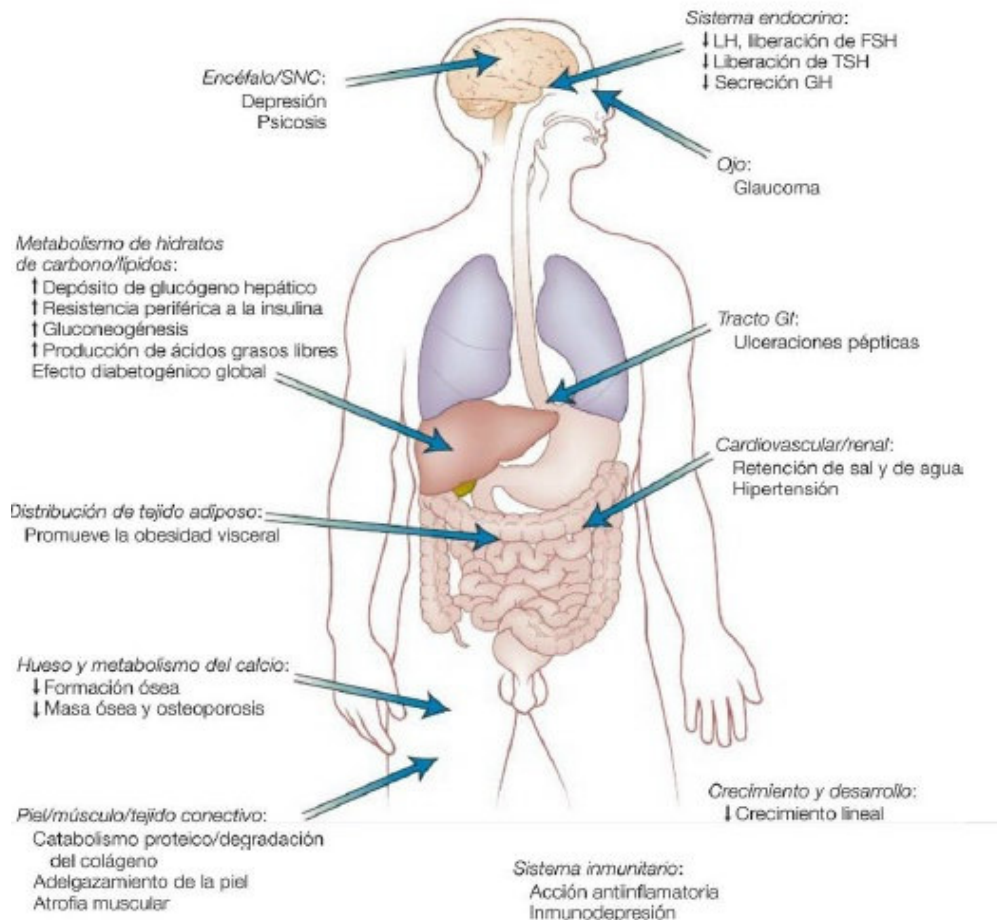


Figura 3.6. Puntos de acción principales de los glucocorticoides en humanos que subrayan algunas consecuencias del exceso de glucocorticoides. Williams. *Tratado de endocrinología*. 13° ed. (2017)

3.6 Hiperplasia Suprarrenal Congénita

La Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) es una patología autosómica recesiva, se produce por un déficit de las enzimas necesarias para la síntesis de hormonas esteroideas,

lo que ocasiona que no se genere la retroalimentación negativa del cortisol, aumentando en circulación la ACTH lo que incrementa la estimulación de la glándula.

3.6.1 Déficit de 21 α -hidroxilasa

Se genera por mutaciones en el gen CYP21 ubicado dentro de HLA, en el cromosoma 6p21.3, el cual está junto al pseudogen CYP21P.

Es el déficit más frecuente que origina la HSC, se genera por una falla en la transformación de 17 α – Hidroxiprogesterona a 11- desoxicortisol, en consecuencia se desencadena una deficiencia de cortisol que no hace el feedback negativo en el hipotálamo y en la hipófisis aumentando la ACTH en la sangre. Además, se produce un aumento de la síntesis de andrógenos por la zona reticular de la corteza suprarrenal y una carencia de mineralocorticoides debido al defecto de la 21- hidroxilación de la progesterona y esto origina que no se sintetice DOC.

Por otra parte, esta enfermedad se puede clasificarse en presentación no clásica y en presentación clásica, la cual se agrupa en virilizante y perdedora de sal y virilizante simple.

En la forma no clásica la enzima 21- alfa hidroxilasa tiene una actividad del 20 al 50%, en la virilizante simple tiene una actividad enzimática entre el 1 al 2% y en la virilizante y perdedora de sal la enzima es inactiva.

En la forma clásica virilizante simple se aumenta la producción de andrógenos debido al incremento de ACTH, ocasionando virilización del feto femeninos, hipertrofia del clítoris, fusión de los labios, ambigüedad genital. En los niños se puede generar una pubertad precoz y vello púbico. Incluso aumenta la velocidad de crecimiento por el incremento de andrógenos. La enzima tiene actividad enzimática del 1 al 2% que alcanza para que la glomerulosa forme una cantidad de aldosterona suficiente para evitar parcialmente la pérdida de sal, el paciente presenta hipotensión, pero no deshidratación.

Los pacientes con presentación clásica virilizante y perdedora de sal posee una enzima 21 – alfa hidroxilasa que es inactiva que causa una deficiencia de aldosterona, hiponatremia, hiperkalemia, deshidratación, hipotensión y aumento de la actividad de la renina plasmática. El incremento de andrógenos en el feto femenino ocasiona ambigüedad

fetal y virilización. En el niño se genera hiperpigmentación de los genitales, aumento del tamaño del pene y pubertad precoz.

En la presentación no clásica, los bebés recién nacidos no presentan alteraciones clínicas y se manifiesta en forma tardía con hiperandrogenismo. Además pueden sintetizar cantidades normales de cortisol y aldosterona. En las mujeres se generan alteraciones como hirsutismo, oligomenorrea y acné. Debido a que la patología no se manifiesta en el nacimiento es necesario hacer la pesquisa para disminuir el índice de morbi-mortalidad. El diagnóstico de esta patología se hace mediante el dosaje de 17OHP. Encontrándose la concentración de dicha hormona elevada, por encima de los valores de referencia. En la forma no clásica, la concentración de 17OHP puede ser normal o no estar tan alta como en la presentación clásica. Cuando se administra ACTH al paciente los valores de 17OHP se incrementan.

Los estudios moleculares se basan en la detección de mutaciones puntuales, conversiones génicas y deleciones génicas en el gen CYP21A2 mediante su identificación y secuenciación.

Las mutaciones más frecuentes son las microconversiones producidas por recombinaciones entre el gen CYP21A1P (gen inactivo) y CYP21A2 (gen activo). En la forma clásica se genera deleciones, conversiones génicas y mutaciones puntuales.

La presentación no clásica es originada por combinaciones ente una mutación severa de CYP21A2 y una mutación leve CYP21A2 o combinación de las 2 mutaciones leves.

El tratamiento consiste en la administración de glucocorticoides (dexametasona o hidrocortisona) para inhibir al eje hipotálamo- hipófisis -glándula suprarrenal, para que disminuya la secreción de ACTH y la producción de andrógenos adrenales. En caso de que haya un déficit de mineralocorticoides se le suministra al paciente 9 alfa – fluorhidrocortisona.

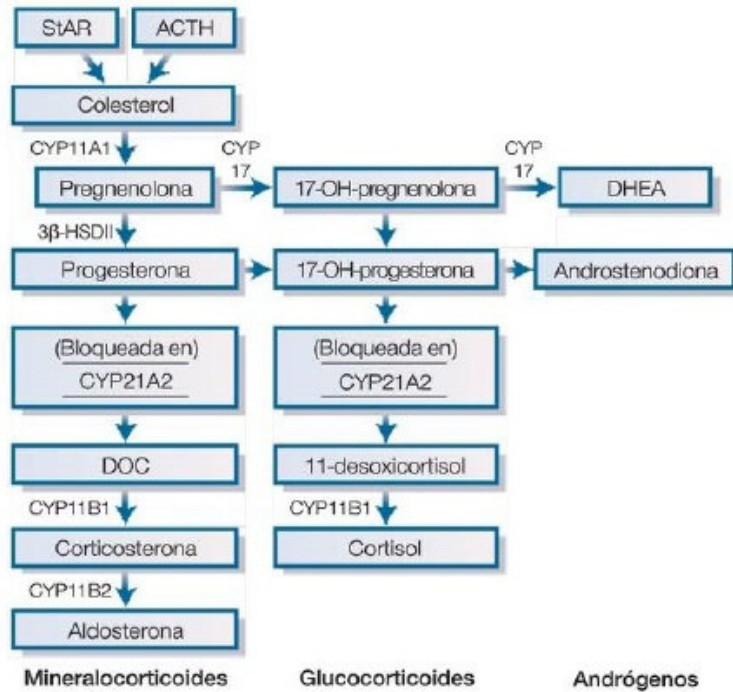


Figura 3.7.1. Hiperplasia suprarrenal congénita relacionada con déficit de 21 α - hidroxilasa. Williams. (2017). Tratado de endocrinología .13^o ed. Elsevier.

3.6.2 Déficit de 11 β – hidroxilasa.

Esta enfermedad es ocasionada por mutaciones en el gen CYP11B1 que genera la inactivación de la enzima y no se produce la transformación de 11 – desoxicortisol a cortisol. Las consecuencias que produce la deficiencia de cortisol que no se genere el retrocontrol negativo del cortisol y esto ocasiona un incremento de ACTH produciéndose un aumento de los andrógenos.

Las manifestaciones clínicas son virilización de feto femenino, ambigüedad genital, hipertensión por el aumento del 11- desoxicorticosterona (ocasiona la reabsorción de sodio y la secreción de potasio).

El diagnóstico se hace con la determinación (sérica basales y estimuladas con ACTH) de 11 – desoxicortisol, 11- desoxicorticosterona y andrógenos.

El tratamiento de basa en la administración de glucocorticoides, con el objetivo de inhibir al eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal, lo que disminuye la estimulación de la glándula al ocasionar un descenso en la concentración de ACTH, produciendo una inhibición de la síntesis de 11- desoxicortisol, desoxicorticosterona y andrógenos. Además, se hace un dosaje en orina de tetrahydro-11-desoxicortisol, tetrahydro-11-desoxicorticosterona y 17 – cetoesteroides.

También existe una forma no clásica de déficit de la enzima 11 β – hidroxilasa, donde tiene elevado los andrógenos adrenales lo que desencadena alteraciones clínicas como acné, hirsutismo, pubertad precoz, estatura, edad ósea avanzada, la interrupción de las menstruaciones, infertilidad, presencia de vello púbico y axilar antes de la pubertad.

Los genes CYP11B1 codifica P450c11 β y CYP11B2 codifica P450aldo se ubican el cromosoma 8q21-22.

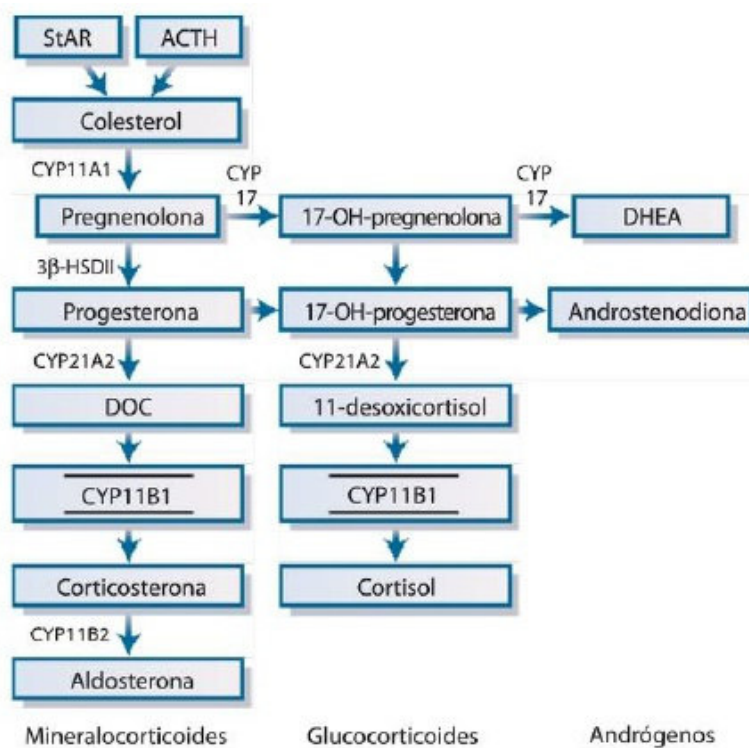


Figura 3.7.2. Hiperplasia suprarrenal congénita relacionada con el déficit de 11 β -hidroxilasa. . Williams. (2017). Tratado de endocrinología .13° ed. Elsevier.

3.6.3. Déficit de 17 α - hidroxilasa

La deficiencia de la enzima 17 alfa- hidroxilasa es causada por mutaciones en el gen CYP17 lo que genera un déficit de cortisol, de andrógenos adrenales y de hormonas esteroideas sexuales. La supresión de retrocontrol negativo aumenta la producción de esteroides que están antes del bloqueo y también está incrementada la concentración de aldosterona.

Las alteraciones clínicas que genera esta enfermedad son: hipertensión, hipotasemia, hipernatremia e hipogonadismo (debido a que no se sintetiza la 17 α - hidroxilasa en las gónadas se produce un trastorno en la producción de hormonas esteroideas sexuales). Además, las mujeres tienen las siguientes manifestaciones clínicas amenorrea primaria, características sexuales ausentes y los hombres presentan un pseudohermafroditismo con genitales externos femeninos (vagina ciega y testículos no descendidos o inguinales).

El tratamiento con glucocorticoides disminuye la concentración de 11-desoxicorticosterona y se restablece el sistema renina-angiotensina- aldosterona, generando un descenso en la presión arterial. Además, el paciente tiene que ser suministrado con hormonas sexuales en la pubertad.

El diagnóstico se fundamenta en que las concentraciones de la 17 alfa- hidroxiladas están disminuidas con falta de capacidad de respuesta a la ACTH o a la GCh. Además, las concentraciones, basales y post estímulo con ACTH, están incrementadas de DOC, corticosterona, 18- hidroxicorticosterona y 18- OH DOC.

El paciente que no es medicado, presenta una inactivación de la renina plasmática y de la aldosterona causada por la producción aumentada de DOC y la hipovolemia. El tratamiento con glucocorticoides genera un descenso en la síntesis de hormonas, de la volemia e incrementa la actividad de la renina en la sangre y de la aldosterona.

La deficiencia de la enzima P450c17 puede ser estudiado mediante la genética molecular, en el cual se puede observar deleciones y duplicaciones de pares de bases.

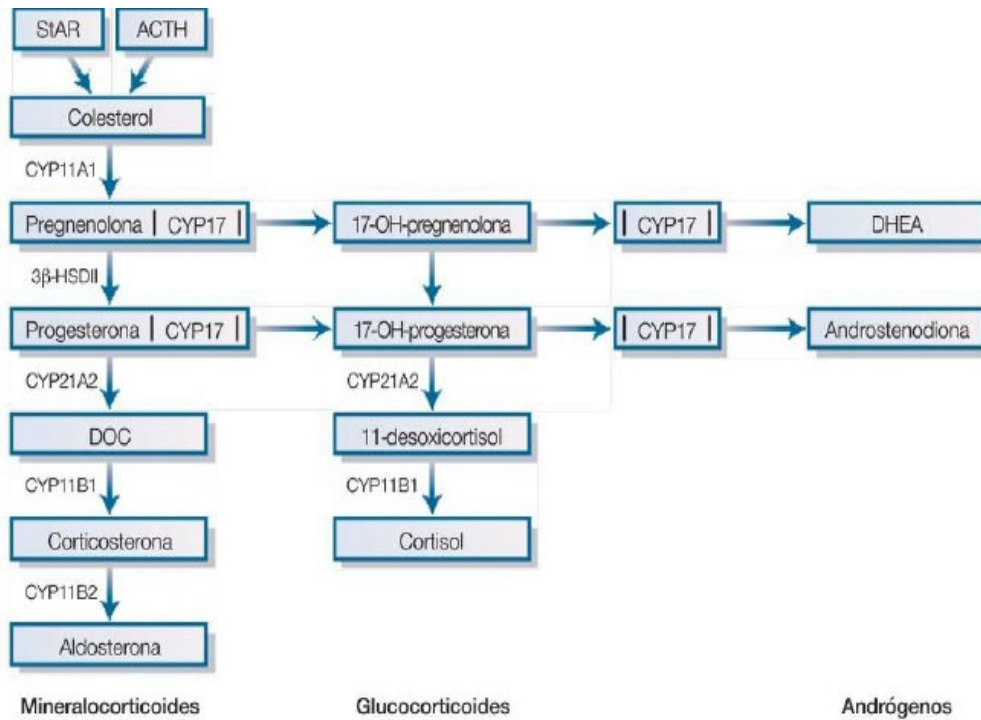


Figura3.7. Hiperplasia suprarrenal congénita asociada al déficit de 17 α – hidroxilasa. . Williams. (2017). Tratado de endocrinología .13° ed. Elsevier.

3.6.4 Déficit de 3 β – hidroxisteroide deshidrogenasa.

La deficiencia de la enzima 3 β – hidroxisteroide deshidrogenasa, es de baja incidencia, ocasiona una disminución de cortisol, de andrógenos débiles que se produce a partir de DHEA y de aldosterona. Este déficit es debido a mutaciones en el gen 3 β -HSD de tipo 2. Las alteraciones clínicas que origina son hiponatremia, hiperpotasemia, pseudohermafroditismo en el hombre con fenotipo femenino debido a que no se expresa la enzima 3 β – HSD2 en los testículos. Además, se puede generar hipospadias, leve virilización en los genitales externos de un feto femenino causado por el incremento de DHEA que se transforma en testosterona, hirsutismo, interrupciones en las menstruaciones, aceleración del crecimiento, la presencia de vello púbico antes de la pubertad, acné e infertilidad.

El diagnóstico se hace con las determinaciones en plasma (basales y post estímulo con ACTH) de pregnenolona, 17- hidroxipregnenolona, DHEA, 16 – hidroxipregnenolona y de 16- hidroxí- DHEA. Incluso los valores de esteroides están altos en orina.

También se puede hacer pruebas de estimulación con GCh que genera el incremento de la síntesis de testosterona en las gónadas.

La medicación se basa en la administración de glucocorticoides, fluorhidrocortisona y esteroides sexuales.

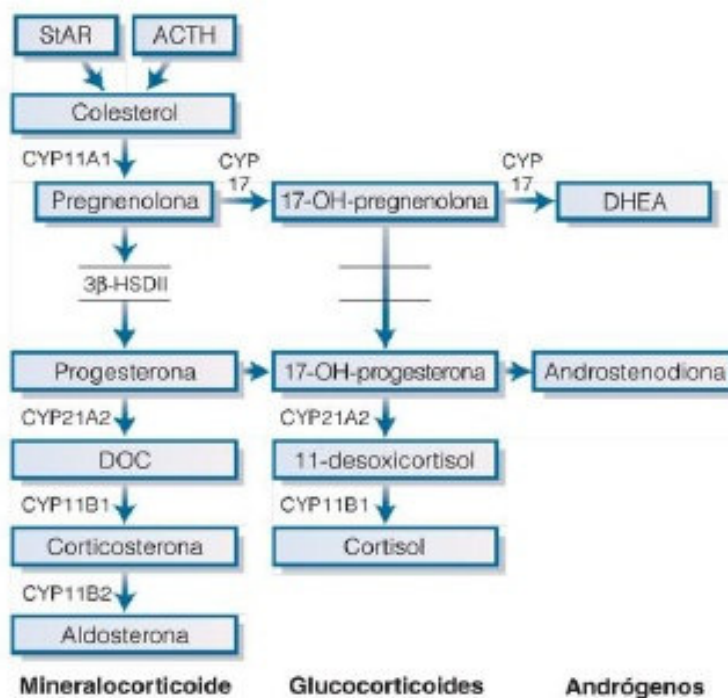


Figura 3.7.4. Hiperplasia suprarrenal congénita asociado al déficit de 3 β – hidroxisteroide deshidrogenasa. Williams. (2017). Tratado de endocrinología .13° ed. Elsevier.

3.6.5. Déficit de la StAR.

El déficit de StAR, se genera por mutaciones en el gen que codifica para StAR, que ocasiona que no se transporte el colesterol desde la membrana externa a la interna, produciendo una deficiencia de todas las hormonas de la corteza suprarrenal y de los esteroides sexuales (situación no compatible con la vida). Las deficiencias parciales cursan con baja producción de esteroides suprarrenales y acumulación de gotas de colesterol que terminan intoxicando a la célula patología denominada síndrome lipóide.

3.6.6. Déficit de cortisona reductasa.

La deficiencia de la enzima cortisona reductasa ocasiona una falla en la transformación de cortisona en cortisol, generando un déficit de cortisol que no realiza la retroalimentación negativa en la hipófisis y en hipotálamo. Debido a que no se lleva a cabo el retrocontrol, la adenohipófisis aumenta la secreción ACTH produciendo una hiperplasia de glándula suprarrenal.

Las manifestaciones clínicas son hirsutismo, alteraciones menstruales, alopecia originado por un aumento de la síntesis de andrógenos.

La medicación es la dexametasona, es administrada para suprimir el eje hipotálamo – hipófisis-glándula adrenal y de esta manera generar la disminución en la producción de andrógenos adrenales.

3.7 Pesquisa de HSC

La provincia de Buenos Aires cuenta con un programa de pesquisa neonatal denominado PRODYTEC (programa de diagnóstico y tratamiento de enfermedades congénitas).” Los programas de pesquisa neonatal son una herramienta del sistema interdisciplinario de Salud Pública, que permite seleccionar entre todos los recién nacidos (RN) vivos, a aquellos presumiblemente afectados por la enfermedad investigada” (Ministerio de salud. *Programa de diagnóstico y tratamiento de enfermedades congénitas PRODYTEC*. . Recuperado el 24 de diciembre de <http://www.ms.gba.gov.ar/sitios/prodytec/>) .Está destinado a patologías difíciles de reconocer clínicamente, cuya evolución espontánea tiene una morbimortalidad elevada y un tratamiento que mejora su evolución si su implementación es precoz. Los casos positivos en la pesquisa deben ser sometidos luego a estudios de confirmación, que permitan establecer el diagnóstico y su correspondiente tratamiento. La HSC es una de las enfermedades incluidas en dicho programa. La pesquisa detecta principalmente a la HSC ocasionada por un déficit de 21 α -hidroxilasa. El Laboratorio de Endocrinología del Hospital de Niños “Sor María Ludovica” es Centro de Referencia para la Confirmación y Seguimiento de HSC. Para la confirmación y el posterior control del tratamiento de dicha patología, se utiliza el dosaje de 17- α -Hidroxiprogesterona por RIA.

3.8. RIA.

Es un ensayo competitivo, en el cual se genera una reacción antígeno – anticuerpo, en donde la hormona de la muestra compite con la hormona marcada con un radioisótopo por los sitios de unión al anticuerpo.

El anticuerpo es una inmunoglobulina producido por células plasmáticas. El isótopo radiactivo son átomos que tiene en su núcleo mayor número de neutrones y tiene que emitir radiaciones que pueden ser detectada mediante un detector de radiaciones.

La sensibilidad es mayor cuando la concentración del anticuerpo es baja y una determinada cantidad de la hormona no se une al anticuerpo.

El formato competitivo puede ser de un paso, que se lleva a cabo con una cantidad limitada de anticuerpos y el de dos pasos posee una concentración infinita de anticuerpos y una alta sensibilidad.

El método utilizado para el dosaje de 17OHP es RIA, pero en los niños menores de 6 meses se hace una extracción previa de la 17OHP debido a que estos pacientes tiene en circulación la 17 – hidroxipregnenolona de origen materno y esto puede generar una reacción cruzada ocasionando falsos positivos.

La concentración de la hormona en la muestra se puede obtener a partir de la extrapolación de una curva de calibración con estándares de concentraciones conocidas. La señal es inversamente proporcional a la concentración de la hormona en la muestra.

3.9 Distribución normal y pruebas no paramétricas

La distribución normal es una función de densidad de variable continua. El grafico se representa como una campana y es simétrica.

La función de la distribución normal es:

$$\begin{aligned}\Phi_{\mu,\sigma^2}(x) &= \int_{-\infty}^x \varphi_{\mu,\sigma^2}(u) du \\ &= \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^x e^{-\frac{(u-\mu)^2}{2\sigma^2}} du, \quad x \in \mathbb{R}.\end{aligned}$$

donde:

- μ es la media (también puede ser la mediana, la moda o el valor esperado, según aplique)
- σ es la desviación estándar
- σ^2 es la varianza
- φ representa la función de densidad de probabilidad

Figura 3.9 Distribución normal. Recuperado el 14 de noviembre de https://es.wikipedia.org/wiki/Distribuci%C3%B3n_normal.

Además, se pueden utilizar gráficos de Q-Q normal, que indica una distribución normal cuando los puntos se alinean a la recta.

Las características más importantes de la distribución normal son: simétrica, la moda, la mediana tiene el mismo valor que la media, los puntos de inflexión se producen en $x = \text{media} + \text{desviación estándar}$ y $x = \text{media} - \text{desviación estándar}$.

3.9.1 Test de Shapiro-Wilk

Este test es utilizado para saber si un conjunto de datos tiene una distribución normal y es aplicado en una cantidad máxima de 50 muestras.

Se descarta que es una distribución normal cuando p valor es menor a alfa y en caso de que p valor sea mayor a alfa se deduce que los datos se distribuyen en forma normal.

3.9.2. Método no paramétrico

El método no paramétrico es empleado cuando los datos no se distribuyen de forma normal.

La prueba de χ^2 de Pearson es una prueba no paramétrica que permite poder analizar si dos variables o dos conjuntos de datos son independientes o están relacionados y examinar si existe una diferencia entre la distribución calculada y la teórica.

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(\text{observada} - \text{estimada})^2}{\text{estimada}}$$

Fórmula 3.9.2. Prueba de χ^2 cuadrado de Pearson. Recuperado el 5 de noviembre de https://es.wikipedia.org/wiki/Prueba_%CF%87%C2%B2_de_Pearson.

3.9.3. Test de Wilcoxon.

Este test se utilizado en muestras relacionadas para comparar si existe diferencia entre las medianas de dos conjuntos de datos que no se distribuyen en forma normal. Si p valor es menor a 0,05 se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, existe una diferencia significativa entre las medianas de los conjuntos de datos analizados.

3.9.4 Concordancia, correlación y regresión de Passing Bablok.

El índice Kappa de Cohen se utiliza para saber el grado de concordancia entre dos observadores o variables y se puede utilizar la interpretación de Landis y Koch para evaluar la fuerza de concordancia que existe entre las variables.

$$\kappa = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e}$$

Fórmula 3.9.4. Coeficiente kappa de Cohen. Recuperado el 15 de noviembre de https://es.wikipedia.org/wiki/Coeficiente_kappa_de_Cohen.

Po es la cantidad de acuerdos observados y Pe es la cantidad de acuerdos esperados.

Coeficiente kappa	Fuerza de la concordancia
0,00	Pobre (<i>Poor</i>)
0,01 - 0,20	Leve (<i>Slight</i>)
0,21 - 0,40	Aceptable (<i>Fair</i>)
0,41 - 0,60	Moderada (<i>Moderate</i>)
0,61 - 0,80	Considerable (<i>Substantial</i>)
0,81 - 1,00	Casi perfecta (<i>Almost perfect</i>)

Tabla 3.10.4. Valoración del coeficiente kappa. Jaime Cerdal y Luis Villaroel del P. *Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa*. Recuperado el 14 de noviembre de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rep/v79n1/art08.pdf>.

El gráfico de Bland Altman indica que cuanto más grande sea la dispersión (diferencia entre los resultados) menor será la concordancia entre las variables. Cuando los puntos están dentro de las líneas de las desviaciones estándar que están por arriba y por debajo de la media indica una buena concordancia.

La correlación y la regresión lineal es aplicada para poder averiguar la relación que existe entre dos variables.

El coeficiente de correlación establece el nivel de asociación que existe entre dos variables y la correlación tiene como objetivo averiguar la fuerza de la asociación.

El coeficiente de correlación Spearman se aplica en pruebas no paramétricas determina la correlación entre dos variables que no se distribuyen de manera normal.

La regresión lineal de Passing Bablok es un método no paramétrico, indica que hay errores sistemáticos proporcionales cuando el intervalo de confianza de la pendiente no incluye al 1 y errores sistemáticos constantes cuando el intervalo de confianza de la ordenada no incluye a 0, revelando que los métodos no se correlacionan, en caso contrario hay una relación entre las variables estudiadas. En el caso de que $r = 0$ indica que no hay una correlación entre X e Y, a medida que aumenta r aumenta la fuerza de la correlación entre las variables.

4. Objetivos.

Evaluar si las dos versiones del kit para la determinación de 17 alfa – Hidroxiprogesterona por RIA, correlacionan entre sí y pueden considerarse concordantes.

Objetivos específicos.

- Comparar dos métodos de campo.
- Hacer foco sobre las diferencias observadas.

- Decidir si el método en uso puede ser reemplazado sin un cambio sistemático significativo sobre los valores de los resultados.

5. Materiales y métodos.

Lugar de trabajo: Hospital de niños “Sor María Ludovica”

Tamaño de la muestra: Se trabajó con 40 muestras de pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 20 días y 18 años que concurrieron al hospital durante el periodo establecido octubre – noviembre de 2019.

Método de dosaje:

El método utilizado para el dosaje de 17OHP es RIA, pero en los niños menores de 6 meses se hace una extracción previa de la 17OHP. Las muestras acondicionadas a temperatura ambiente se las mezcla bien antes de comenzar la extracción. Se le agrega a la muestra éter etílico y se agita con vortex. Posteriormente se congela la fase acuosa, se extrae la fase orgánica y se la transfiere a otro tubo. Por ultimo se evapora la fase orgánica bajo campana.

A las muestras de suero, los extractos, el control y los calibradores se le agrega el trazador ^{125}I 17OHP en tubos que este revestido de anticuerpos anti 17OHP. Se mezcla y se incuba 30 minutos a 37 °C. A continuación, se decanta el contenido de los tubos y se lo lava con solución de lavado para retirar el exceso de trazador no unido a los anticuerpos. Se hace la determinación a través de un contador gamma. Las cuentas por minutos de la muestra se le divide por las cuentas por minutos del calibrador cero, el resultado de esa división se extrapola en la curva de calibración obteniéndose la concentración de 17OHP. La construcción de la curva de calibración se hace en un papel logit-log donde se grafica en el eje X el log de la concentración de los calibradores en el Y logit la relación entre las cuentas por minutos de cada uno de calibradores y las cuentas por minuto del calibrador cero. Este procedimiento se hace con la nueva y actual versión de radioinmunoensayo. El control de calidad se utiliza para confirmar una excelente calidad en los resultados de las muestras.

5.1 Programas informáticos:

- ✓ Para la recolección de datos y el armado de base de datos se utilizó el programa Excel.
- ✓ Se realizó el análisis estadístico con el software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) y method validator ,

5.2 Tratamiento estadístico

Se hizo el análisis de distribución normal mediante el test de normalidad de Shapiro Wilk, se aplicó una prueba no paramétrica (Chi- cuadrado de Pearson) debido a que los datos no se distribuían de forma normal para evaluar si se trataban de métodos independientes o relacionados. Luego se realizó el test de Wilcoxon para evaluar si había una diferencia entre las medianas de ambos métodos. Después se examinó la concordancia mediante el gráfico Bland Altman y el coeficiente kappa de Cohen. Posteriormente se realizó la correlación Rho de Spearman para evaluar la relación entre ambos métodos. Por último, se procedió con la curva de regresión de Passig Bablok para analizar si existían una correlación, errores sistemáticos constantes y proporcionales.

6. Resultados

[17OHP] ng/ml (actual versió)	[17OHP] ng/ml(nueva versió)
2,6	2,3
2,6	1,7
2,6	0,68
2,6	0,52
2,6	1,3
2,6	1,3
2,6	1,1
2,6	1,1
2,6	0,38
2,6	0,26
2,6	4,6
0,7	0,8
0,9	0,95
4	3,8
0,64	0,68
1,7	1,7
0,66	0,75
2,6	2,6
38	38
0,34	0,34
0,26	0,26
0,6	0,9
0,26	0,25
1,1	1,1
0,38	0,38
0,57	0,57
0,95	1,1
2,9	3,1
40	43
0,31	0,36
0,35	0,28
15	15
0,35	0,11
0,75	1,1
1,1	1,5
0,85	1
40	47
0,35	0,12
0,4	0,52
1,3	1,3

Tabla 6. 1.: Determinación de 17OHP por la nueva versión (NV) y actual versión (AV).

Análisis de datos:

Se realizó la evaluación de la distribución de los datos a través de test de Shapiro Wilk.

Ho (hipotesis nula): los datos se distribuyen de manera normal.

H1(hipotesis alternativa): los datos no se distribuyen de forma normal.

Nivel de significancia (α) = 0,05

El nivel de significancia es la probabilidad de cometer un error al rechazar la hipotesis nula.

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Método actual	,403	40	,000	,406	40	,000
Método nuevo	,403	40	,000	,408	40	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 6.2.: Prueba de normalidad

El test de Kolmogorov-Sminov no se utilizó ya que es para una cantidad mayor a 50 muestras y por lo tanto se aplicó el test de Shapiro-Wilk que es para una cantidad máxima de 50 muestras.

En la prueba de normalidad del test de Shapiro -Wilk tenía una significancia de 0,00, que es menor a al nivel de significación de 0,05, por lo tanto, se descartó la hipotesis nula determinándose que los datos no se distribuían de forma normal.

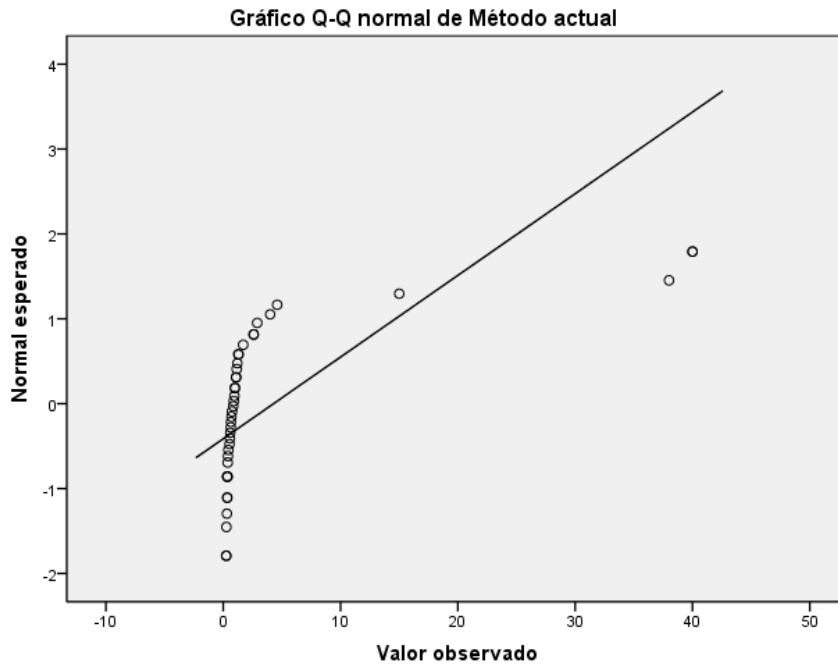


Gráfico 6.3.: Q-Q normal de método actual.

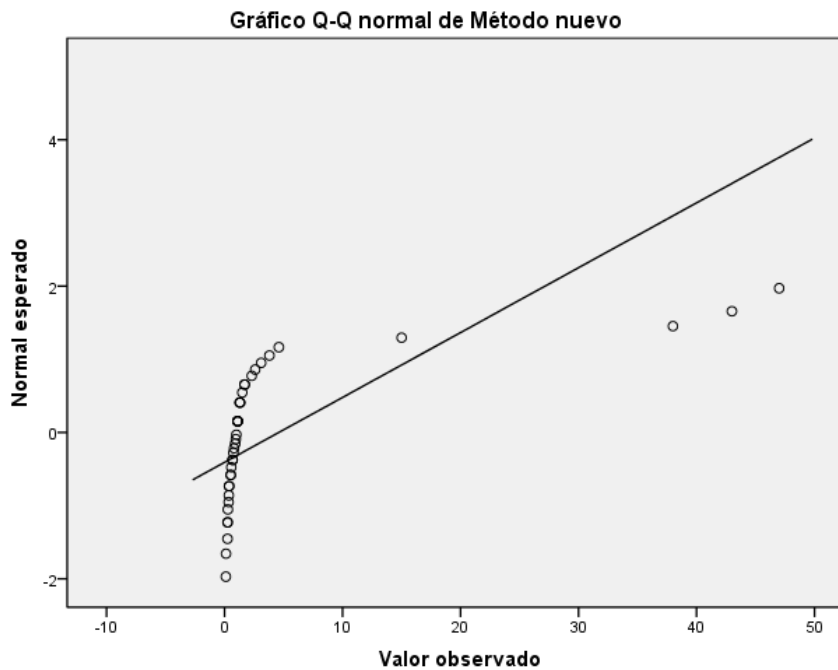


Gráfico 6.4.: Q-Q normal del método nuevo.

En el grafico 6.3. y 6.4. los puntos de los datos no están alineados a la recta, indicándonos que no existía una distribución normal en ambos métodos.

Debido a que los datos no se distribuían de manera normal se utilizó el Chi- cuadrado de Pearson para evaluar el si los métodos son independientes o están relacionados.

Ho: Variables independientes

H1: Variables relacionadas

Nivel de significación (α) = 0,05.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	848,667 ^a	840	,410
Razón de verosimilitudes	232,562	840	1,000
Asociación lineal por lineal	38,793	1	,000
N de casos válidos	40		

a. 899 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,03.

Tabla 6.5.: Prueba de Chi- cuadrado de ambos métodos

El valor de la sig. asintótica calculado es mayor al nivel de significación por lo tanto se rechazó la hipótesis nula y se determinó que los dos métodos están relacionados.

Después se realizó la evaluación de las medianas de ambos métodos para saber si existían diferencias mediante el test de Wilcoxon para muestras relacionadas.

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre método nuevo y método viejo es igual a 0.	Prueba de Wilcoxon de los rangos con signo de muestras relacionadas	,014	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

Tabla 6.6. Test de Wilcoxon.

En test de Wilcoxon se obtuvo un p valor menor al nivel de significancia (0,05), por lo tanto, se rechazó la hipótesis nula y se deduzco que existía una diferencia significativa entre las medianas de los dos métodos.

Luego se realizó el gráfico de Bland Altman para saber si había una concordancia entre los métodos analizados.

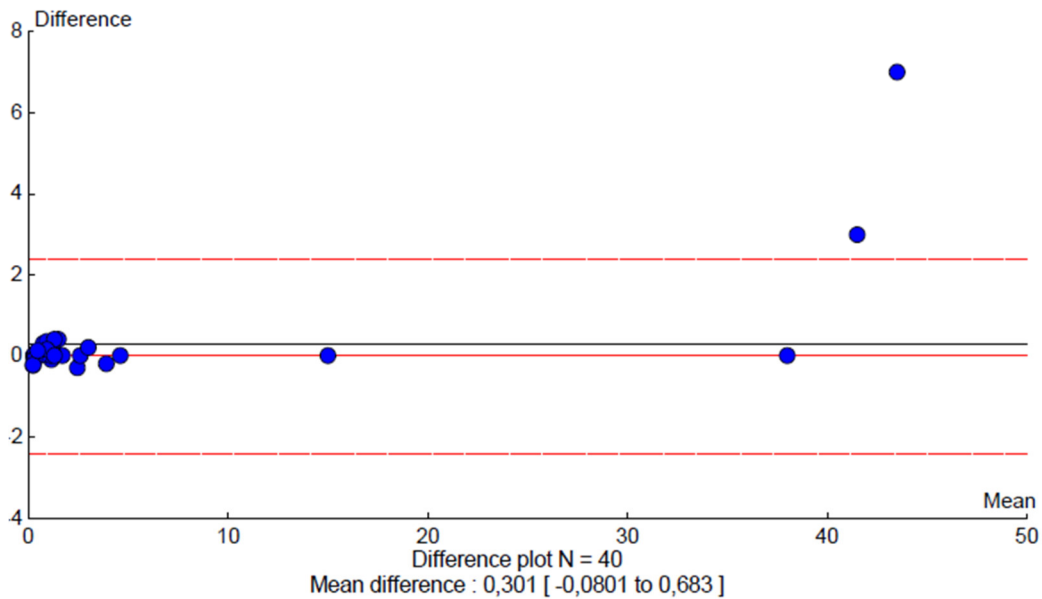


Gráfico 6.7. Bland Altman de ambos métodos.

En el gráfico de Bland Altman los límites de confianza de la media incluían al 0 indicando una concordancia entre los dos métodos y además la mayoría de los puntos estaban dentro de los límites aceptables, en las líneas de los desvíos estándar, indicando que hay un buen acuerdo entre ambos métodos.

Medidas simétricas

	Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Medida de acuerdo Kappa	,258	,070	10,951	,000
N de casos válidos	40			

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

Tabla 6.8. Índice kappa.

El índice Kappa de Cohen indicó que existía una concordancia aceptable según la escala de Landis y Koch entre los métodos ya que el valor calculado del índice está dentro del intervalo (0,21-0,40).

Posteriormente se hizo la correlación Rho de Spearman con el objetivo examinar la fuerza de asociación entre ambos métodos analizados.

Correlaciones			Método actual	Método nuevo
Rho de Spearman	Método actual	Coefficiente de correlación	1,000	,977**
		Sig. (bilateral)	.	,000
		N	40	40
	Método nuevo	Coefficiente de correlación	,977**	1,000
		Sig. (bilateral)	,000	.
		N	40	40

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 6.6.: Correlación de Rho de Spearman de los métodos

El coeficiente reveló una correlación fuerte entre los métodos, ya que el método actual tenía un coeficiente de correlación de 1 y el otro método tenía un coeficiente de 0,97 (a medida que aumenta el coeficiente Rho de Spearman aumenta la correlación).

Después se realizó la regresión de Passing Bablok para saber si ambos métodos eran comparables y equivalentes.

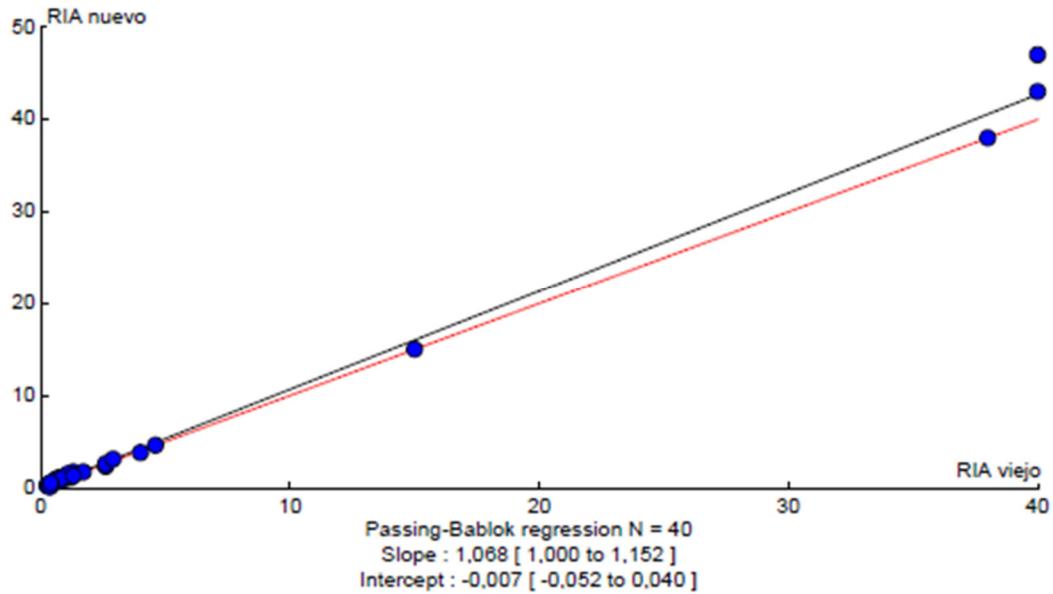


Gráfico 6.9.: Regresión lineal de los dos métodos.

Resumen del modelo				
Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,997 ^a	,995	,995	,83367

Tabla 6.10. Cálculo de R.

En el gráfico 6.9. se visualiza que no existe un error sistemático constante significativo debido a que el intervalo de confianza de la ordenada incluye al 0 y tampoco hay un error sistemático proporcional significativo ya que el intervalo de confianza la pendiente incluye al 1, es decir que los métodos comparados son equivalentes considerando un intervalo de confianza del 95%.

Estimación del sesgo a partir de la ecuación de la recta:

$Y = 1,068 X - 0,007$ $X = \text{valor verdadero} = 4,29$ (media del método actual y valor evaluado)

$$Y = 1,068 \times 4,29 - 0,007 = 4,57$$

Y = Valor que se obtiene con la nueva versión del método (valor obtenido)

Sesgo % = (valor obtenido – valor evaluado) / valor evaluado x 100

$$\text{Sesgo \%} = (4,57 - 4,29) / 4,29 \times 100 = 0,065\%$$

Según la tabla de variabilidad biológica el error sistemático permitido es de 14%, la nueva versión tenía un % sesgo que es menor al 50% del requisito de la calidad (7 %). Por lo tanto, el error obtenido en el nuevo método analizado se lo consideró insignificante y la nueva versión de RIA es exacto.

Coefficiente de variación = desviación estándar / media x 100

$$\text{Coefficiente de variación método nuevo} = 11,28341 / 4,5953 \times 100 = 245,54. = 2,45 \%$$

$$\text{Coefficiente de variación método actual} = 10,3907 / 4,2940 \times 100 = 241,98. = 2,42\%$$

El error aleatorio permitido obtenido en la tabla de variabilidad biológica es de 9,8 %, el método nuevo tenía un coeficiente de variación (2,45%) menor al 50% del requisito de la calidad (4,9%), lo que indicó que era despreciable el error aleatorio y que el método nuevo es preciso.

$$\text{ET\%} = 1,65 \times 2,45 \% + 0,065 \% = 4,10 \%$$

Según la tabla de variabilidad biológica el error total aceptable es de 30,2, el método analizado tenía un error total menor al 50 % del error total aceptable (15,1 %).

Descriptivos			Estadístico	Error típ.
Método actual	Media		4,2940	1,64292
	Intervalo de confianza para la	Límite inferior	,9709	
	media al 95%	Límite superior	7,6171	
	Media recortada al 5%		2,5344	
	Desv. típ.		10,39072	
	Coficiente de variación		241,98 18	
	Mediana		,8750	
Método nuevo	Media		4,5953	1,78406
	Intervalo de confianza para la	Límite inferior	,9866	
	media al 95%	Límite superior	8,2039	
	Media recortada al 5%		2,5994	
	Desv. típ.		11,28341	
	Mediana		1,0500	

Tabla 6.11. Estadísticos descriptivos.

7. Discusión

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede decir que los datos de los dos métodos no se distribuían de manera normal ya que tenían una significancia asintótica en el test de Shapiro menor a 0,05. En la prueba no paramétrica de Chi-cuadrado de Pearson la significancia obtenida mediante el software SPSS era mayor a 0,05 indicándonos que los métodos estaban relacionados y no eran independientes. Aunque existía una diferencia significativa entre las medianas, el análisis de correlación de ambos métodos tenía coeficientes Rho de Spearman igual a 1 o cercanos a 1, demostrándonos que hay una fuerte asociación entre la actual y nueva versión de RIA. La gráfica de Bland Altman y el índice kappa reveló una buena concordancia entre los métodos. En la regresión lineal de Passig Bablok y el % de sesgo indicó que no existía errores sistemáticos significativos

y los métodos eran equivalentes. Además, el coeficiente de variación del método nuevo calculado era menor al 50% del error aleatorio aceptable, se deduzco que tenía precisión la nueva versión de RIA y por lo tanto es válido y se puede utilizar en el diagnostico de HSC por déficit de 21-hidroxilasa.

8.Conclusión

Mediante el análisis estadístico realizado en esta tesis se puede concluir que existe una fuerte correlación y una buena concordancia entre los métodos. Sin embargo, se obtuvo una diferencia significativa entre las medianas, pero los resultados obtenidos demuestran que los dos métodos poseen precisión semejante, lo que nos lleva a pensar que, bajo nuestras condiciones usuales de operación, el cambio de metodología no disminuiría la precisión de los datos obtenidos. Además, el método nuevo tiene un error sistemático menor al error sistemático aceptable por lo tanto es exacto. También no tiene errores sistemáticos constantes y proporcionales, lo que indica que los dos métodos son equivalentes y la nueva versión de RIA puede remplazar el método actual.

9. Bibliografía

- ❖ Lippincott Williams & Wilkins (2010). *Manual de endocrinología y metabolismo*. (4° ed) Wolters Kluwer Health España, S. A.
- ❖ Williams. (2017). *Tratado de endocrinología*. 13° ed. Elsevier.
- ❖ David G. Gardner & Dolores Shoback (2012) . *Endocrinología básica y clínica*. (9° ed.). Mac Graw Hill.
- ❖ Graciela Queiruga , Aida Lemes, Cristina Ferolla , María Machado , Cecilia Queijo , Paola Garlo , Gabriela Parallada (2010) . *Pesquisa neonatal : lo que puede prevenir una gota de sangre* .
<https://www.bps.gub.uy/bps/file/6484/1/pesquisa-neonatal.pdf>.
- ❖ Jesús Mallol (2008). *Manual de radiofarmacia*. (1° ed). Ediciones Diaz de Santos. S.A.
- ❖ Jay L. Devore. (2008). *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias*. (7° ed.) . Cengage Learning .
- ❖ Matías Riquelme (2019). *¿Qué es y cómo se interpreta el coeficiente de correlación de Pearson?* Recuperado el 5 de noviembre de <https://www.webyempresas.com/coeficiente-de-correlacion-de-pearson/>.
- ❖ Mónica Alejandra Mondragón Barrera. (2014) *Uso de la correlación de Spearman en un estudio de intervención de fisioterapia*. Recuperado el 5 de noviembre de https://www.researchgate.net/publication/281120822_USO_DE_LA_CORRELACION_DE_SPEARMAN_EN_UN_ESTUDIO_DE_INTERVENCION_EN_FISIOTERAPIA.
- ❖ *Factor esteroideogénico 1*. (s.f). Recuperado el 20 de octubre de https://en.wikipedia.org/wiki/Steroidogenic_factor_1.
- ❖ *Dax1*.(s.f) .Recuperado el 20 de octubre de <https://en.wikipedia.org/wiki/DAX1>.

- ❖ *Coefficiente Kappa de Cohen* (s.f). Recuperado el 8 de noviembre de https://es.wikipedia.org/wiki/Coefficiente_kappa_de_Cohen.

- ❖ Manuel Molina. *Otra piedra con la que no tropezar. El método de Bland-Altman para medir acuerdo*. (2015). Recuperado el 8 de noviembre de <https://anestesiari.org/2015/otra-piedra-con-la-que-no-tropezar-el-metodo-de-bland-altman-para-medir-acuerdo/>.

- ❖ Gabriel Cavada Ch. *Concordancia Parte II: el método de Bland-Altman*. (2013) Recuperado el 8 de noviembre de <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:xonIT7T-b4IJ:revistasoched.cl/3-2013/8-Cavada.pdf+&cd=15&hl=es&ct=clnk&gl=ar>.

- ❖ Victoria Alea, Montserrat Guillen, Carmen Muñoz, Elizabet Torrelles y Núria Viladomiu. (2000). *Estadística con SPSS v .10.0* (1 ° ed). Universitat de Barcelona.

- ❖ *Pasando – Regresión de Bablok*. (s.f) Recuperado el 8 de noviembre de https://en.wikipedia.org/wiki/Passing%E2%80%93Bablok_regression .

- ❖ Jaime Cerdal y Luis Villaroel de *P. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa*. (2008) Recuperado el 8 de noviembre de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rcp/v79n1/art08.pdf>.

- ❖ Jaime Cerdal y Luis Villaroel del P. *Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa*. Recuperado el 14 de noviembre de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rcp/v79n1/art08.pdf>.

- ❖ *Distribución normal*. Recuperado el 14 de noviembre de https://es.wikipedia.org/wiki/Distribuci%C3%B3n_normal.

- ❖ *Test de Shapiro- Wilk*. Recuperado el 14 de noviembre de https://es.wikipedia.org/wiki/Test_de_Shapiro%E2%80%93Wilk.

- ❖ *Prueba de χ^2 cuadrado de Pearson*. Recuperado el 5 de noviembre de https://es.wikipedia.org/wiki/Prueba_%CF%87%C2%B2_de_Pearson.

❖ *Coeficiente kappa de Cohen.* Recuperado el 15 de noviembre de https://es.wikipedia.org/wiki/Coeficiente_kappa_de_Cohen