

Vera, Pablo Mariano

Correlación de dos métodos para ladeterminación de 17-Hidroxiprogesterona

2021

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución – no comercial – sin obra derivada 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:

Vera, P. M. (2021) *Correlación de dos métodos para ladeterminación de 17-Hidroxiprogesterona*. [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>

Correlación de dos métodos para la determinación de 17-Hidroxiprogesterona

CARRERA DE BIOQUIMICA. INSTITUTO DE
CIENCIAS DE LA SALUD.

Alumno: Vera, Pablo

Legajo: 3178

Directora: TOUNIER, ANDREA

Fecha de entrega: 09 de diciembre de 2021

Resumen

Introducción: La 17α -hidroxiprogesterona (17OHP) es un metabolito intermediario producido en las vías esteroidogénicas de la corteza suprarrenal. El dosaje de 17OHP permite evaluar la función endócrina de las glándulas suprarrenales. Una de las patologías endócrinas más frecuentes en pediatría es la hiperplasia suprarrenal congénita (HSC), que resulta de la deficiencia o ausencia de total de una enzima que participa en la biosíntesis de hormonas esteroideas. El déficit de 21-hidroxilasa es el más frecuente, ocasiona aumento de los niveles de 17OPH, este metabolito se determina mediante el método de radioinmunoensayo (RIA). Un resultado preciso y exacto es imprescindible para llegar a un diagnóstico certero y realizar el tratamiento, control y seguimientos de los pacientes.

Objetivo: Correlacionar dos métodos de dosaje de 17OHP in vitro utilizando muestras de pacientes a partir de la introducción en el mercado de un nuevo método analítico.

Materiales y métodos: Se trabajó con muestras de pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre los 15 días y 30 años, que concurrieron al hospital durante el periodo establecido de abril a octubre de 2020 para el diagnóstico y control de tratamiento de hiperplasia suprarrenal, amenorreas y sospecha de pubertad precoz. Se realizó la determinación 17OHP mediante dos métodos, RIA y quimioluminiscencia Maglumi® 600. Se evaluaron características de la población, estadísticos descriptivos de las muestras, se evaluó la distribución, se realizó el test Wilcoxon, análisis de correlación, gráficos de Bland Altman para evaluar error sistemático, cálculo del sesgo, coeficiente de variación, el error total y finalmente la regresión de Passing-Bablok.

Resultados: El análisis de la distribución de los datos mostró que no se distribuían de manera normal, el test Wilcoxon indicó que existe una diferencia significativa en las medianas de ambas metodologías. En el análisis de correlación de Spearman se observó una buena correlación entre los dos métodos, esta es positiva y clasificada como fuerte. En cuanto al análisis de las diferencias realizado mediante gráficos de Bland-Altman, se calculó una diferencia media relativa de 10,7 %, este valor es menor al límite de

desviación deseable con criterio de variabilidad biológica (13,5%). El coeficiente de variación, sesgo o BIAS y error total del nuevo método, para dos niveles de control de calidad cumplen con el criterio de variabilidad biológica. En el análisis de la regresión de Passing Bablok se obtuvo la siguiente ecuación de la recta: $y = 1,116x + 0,0130$.

Discusión y conclusión: Según el análisis estadístico, ambos métodos de dosaje de 17OHP, se consideran intercambiables y equivalentes puesto que hay concordancia entre ambos, cumplen con el criterio de variabilidad biológica para el análisis de la diferencias de Bland-Altman, CV, sesgo y error total. La regresión lineal mostró que existe un mínimo sesgo proporcional que no condiciona la utilidad clínica.

Por lo expuesto, los dos métodos se consideran adecuados para el diagnóstico clínico, recomendando que el seguimiento de los pacientes se realice siempre por un mismo método.

1. Índice

| | |
|--|----|
| Resumen | 1 |
| 1. Índice | 3 |
| 2. Abreviaturas | 4 |
| 3. Introducción general | 5 |
| 4. Introducción específica | 6 |
| 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP) | 6 |
| Las glándulas suprarrenales | 7 |
| Embriogenia | 8 |
| Esteroidogénesis | 10 |
| Metabolismo del colesterol | 11 |
| Síntesis de Glucocorticoides | 13 |
| Síntesis de andrógenos | 14 |
| Regulación de la secreción | 15 |
| Síntesis de aldosterona | 16 |
| Hiperplasia suprarrenal congénita | 17 |
| Diagnóstico | 22 |
| Pesquisa de HSC | 23 |
| Importancia del dosaje de 17OHP | 24 |
| 5. Objetivos | 25 |
| Objetivo general | 25 |
| Objetivos específicos: | 25 |
| 6. Materiales y métodos | 26 |
| Materiales esenciales: | 26 |
| Métodos de medición | 26 |
| i. RIA | 26 |
| ii. Quimioluminiscencia Maglumi [®] 600 | 27 |
| Software y plan de análisis estadístico | 27 |
| Evaluación de errores y valores aberrantes | 29 |
| 7. Resultados | 30 |
| 8. Discusión | 43 |

| | |
|------------------|----|
| 9. Conclusión | 44 |
| 10. Bibliografía | 45 |

2. Abreviaturas

ACTH: Hormona adrenocorticotrópica

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

DHEA: Dehidroepiandrosterona

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DOC: Desoxicorticosterona

17OHP: 17 α -hidroxiprogesterona

RIA: Radioinmunoensayo 17 α - Hydroxyprogesterone

HSC: Hiperplasia Suprarrenal Congénita

DMR: Diferencia media relativa

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

StAR: Steroidogenic Acute Regulatory protein

ADR: Adrenodoxina reductasa

HHS: Eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (o suprarrenal)

Adx: adrenodoxina

DA: Diferencia absoluta

DAM: Diferencia absoluta media

DAN: Diferencia absoluta normalizada

DAMN: Diferencia absoluta media normalizada

3. Introducción general

La 17OHP es un metabolito que permite evaluar la función endocrinológica de las glándulas suprarrenales. Estas glándulas se encuentran formadas por una corteza y una médula que poseen funciones distintas rodeadas por una cápsula de tejido conectivo. La corteza se divide en tres zonas: zona glomerular productora de mineralocorticoides (aldosterona), zona fascicular productora los glucocorticoides (cortisol) y zona reticular productora de andrógenos. La médula sintetiza las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). La producción de glucocorticoides y de andrógenos está regulada por el eje hipotálamo- hipófisis - adrenal. El hipotálamo secreta la CRH (hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa) la cual estimula a la hipófisis para que produzca ACTH (hormona adrenocorticotropa) que actúa sobre la zona fascicular y reticular de la corteza adrenal; y en menor medida sobre la zona glomerular, aunque su acción no es necesaria.

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) es una de las alteraciones endócrinas más frecuentes en niños, comprende un conjunto de anomalías con un patrón de herencia autosómica recesiva que se caracteriza por una deficiencia enzimática, la cual altera la síntesis de productos adrenales, en especial el cortisol. La HSC es una de las patologías caracterizadas por presentar ambigüedad genital, siendo su causa más frecuente.

El motivo más habitual de HSC es el déficit de 21-hidroxilasa que resulta de mutaciones en el gen CYP21A2. La 21-hidroxilasa está involucrada en la biosíntesis de cortisol y aldosterona, por tanto en la HSC habrá déficit de cortisol, aldosterona y aumento anormal de andrógenos. Existen diferentes fenotipos de la enfermedad que dependen de la severidad del defecto enzimático. Se presenta en tres formas clínicas: perdedora de sal y virilizante simple, ambas descritas como formas clásicas, estas son diagnosticadas por lo general en las primeras semanas de vida, y una forma de comienzo tardío que se describe como forma no clásica. El diagnóstico requiere el dosaje de 17OHP entre otras determinaciones y estudios.

La 17OHP actualmente es determinada mediante el método de RIA (radioinmunoensayo), de diseño 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. Por otro lado, se pretende realizar el dosaje de 17OHP con un nuevo método analítico que tiene como ventaja ser automatizado y no isotópico, este nuevo método es un inmunoensayo de quimioluminiscencia competitivo (plataforma Maglumi ® 600).

El dosaje de 17OHP es fundamental para arribar a un diagnóstico preciso y evitar complicaciones clínicas, además permite poder dar seguimiento y control a los pacientes que lo requieran. Por este motivo es de suma importancia correlacionar las dos metodologías de análisis.

4. Introducción específica

17 α -hidroxiprogesterona (17OHP)

La 17OHP es un metabolito esteroide producido en las glándulas adrenales y las gónadas. En las glándulas adrenales se produce como parte del proceso de producción de la hormona cortisol, por medio de la acción secuencial de las enzimas 21-hidroxilasa y 11 β -hidroxilasa.

El metabolito 17OHP deriva del colesterol. No es una hormona esteroidea activa, pero es un precursor que puede convertirse en hormonas activas.

El dosaje de 17OHP permite evaluar la función endocrinológica de las glándulas suprarrenales.

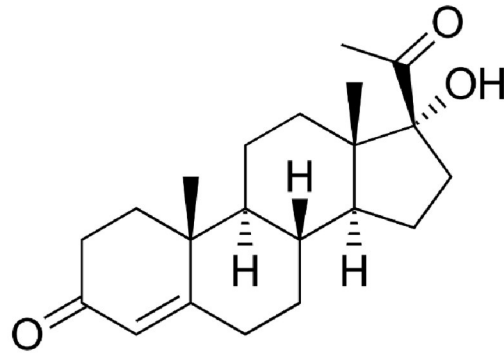


Figura 1. Fórmula de 17OPH.

Las glándulas suprarrenales

Las glándulas adrenales son estructuras piramidales bilaterales, en los seres humanos se denominan también glándulas suprarrenales porque se encuentran situadas sobre el polo superior de cada riñón, pesan aproximadamente entre 4 y 5 gr cada una y miden aproximadamente 2 cm x 5 cm ⁽⁸⁻⁾. Están constituidas por dos tejidos bien delimitados con funciones y orígenes embriológicos diferentes. Tejido neuronal y epitelial (o pseudoepitelial) que conforman una corteza externa y una médula interna, ambas rodeadas de una cápsula de tejido conectivo; la corteza comprende 90% del peso suprarrenal, y la médula interna, alrededor de 10%.

La glándula suprarrenal está perfundida por las ramas suprarrenales superior, media e inferior de la arteria frénica inferior, directamente desde la aorta, y desde las arterias renales. Al llegar a la glándula suprarrenal, estas arterias se ramifican y forman un plexo bajo la cápsula que riega la corteza suprarrenal.

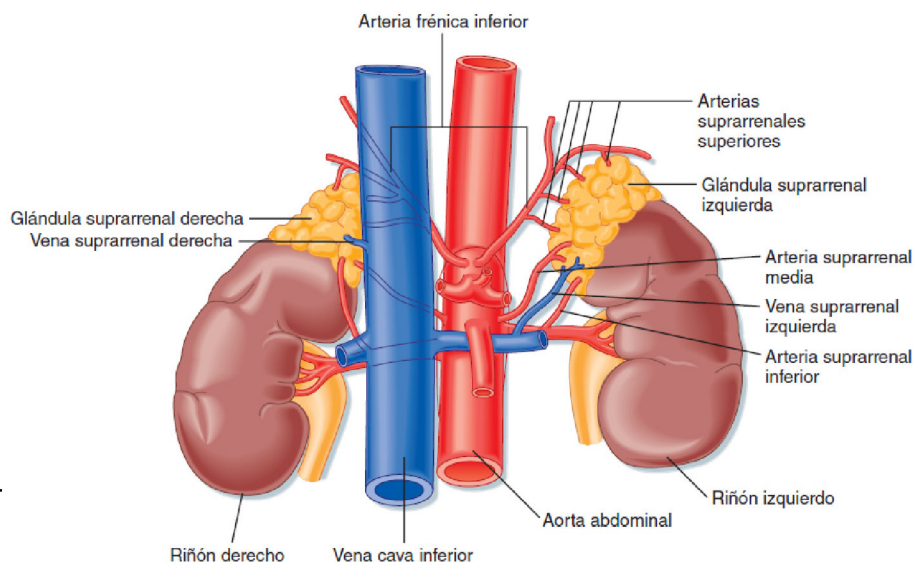


Figura 2. Ubicación e irrigación de las glándulas suprarrenales. Berne y Levy. *Fisiología*. 2009 6° ed. (2009). (Modificado de Drake RL et al: *Gray's Anatomy for Students*, Filadelfia, Churchill Livingstone, 2005.)

Embriogenia

Embriológicamente corteza y médula tienen un origen distinto.

Embriogenia de la corteza adrenal

Las células de la porción externa, denominada corteza suprarrenal, se desarrollan a partir de células mesodérmicas localizadas en la vecindad del polo superior del riñón en desarrollo, estas células derivan de la cresta urogenital y tienen un origen embriológico común con la gónada y el riñón. La diferenciación temprana del primordio adrenogonadal a partir de la cresta urogenital requiere cascadas de señalización y transcripción de factores GLI3, SALL1, FOXD2, WT1, PBX1 y WNT4, y el regulador de la actividad de la telomerasa, ACD. El primordio adrenogonadal puede verse como la parte medial de la cresta urogenital a las 4 semanas (⁸-) (Fig. 3).

La separación del primordio adrenogonadal y la formación del primordio adrenal o suprarrenal se dan aproximadamente en la semana 8 de gestación. En el primordio adrenal pueden diferenciarse dos capas distintas, la zona fetal interna (FZ) y la zona definitiva exterior (DZ) que más tarde se transformará en la glándula suprarrenal adulta. La zona fetal luego de los 6 meses del nacimiento es sustituida por la zona definitiva que prolifera y da origen a una zona fasciculada interna (ZF) y una zona glomerulosa externa (ZG), la zona reticular (ZR) es la capa más interna y se evidencia recién después de los 2 años de vida (⁸).

Para el desarrollo tanto de las glándulas suprarrenales como de las gónadas y de las células gonadótropas es necesaria la expresión de los genes SF-1 (factor esteroideogénico 1) y DAX1 (reversión sexual dosis-sensible 1), la mutación o delección de este gen provoca la falta o desarrollo insuficiente de la suprarrenal y de las células gonadótropas (2-).

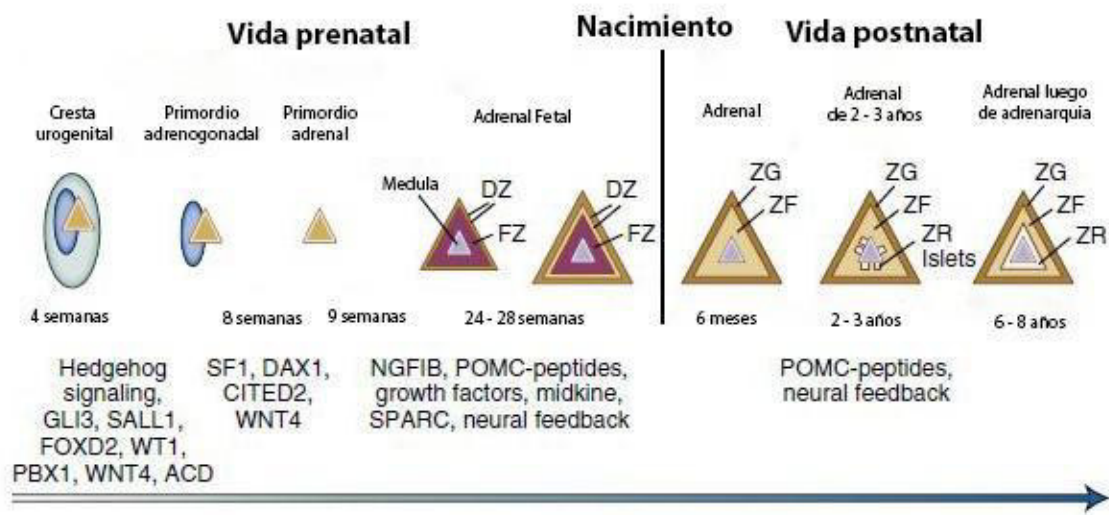


Figura 3. Diagrama esquemático del desarrollo de la corteza suprarrenal humana durante el periodo prenatal y vida posnatal, se muestran factores de transcripción que están activos en cada etapa. DZ, zona definitiva; FZ, zona fetal; POMC, pro-opiomelanocortina; SPARC, proteína secretada, ácida, rica en cisteína (osteonectina); ZF, zona fasciculada; ZG, zona glomerulosa; ZR, zona reticularis. Adaptado de Williams. *Textbook of endocrinology* (p. 484) 14th ed. (2020).

Embriogenia de la medula adrenal

Cerca de la quinta semana de gestación las células primitivas de la cresta neural migran hacia la región torácica para formar la cadena simpática posterior, luego emigran en dirección anterior para formar ganglios. En la sexta semana de gestación las células primitivas se desplazan hacia la corteza suprarrenal y entran para formar la médula suprarrenal, la presencia de la medula se evidencia hacia la octava semana de gestación.

La médula adrenal está compuesta por células cromafines o feocromocitos que derivan de la cresta neural.

Las células cromafines de la medula adrenal se encuentran inervadas por neuronas del sistema simpático, sintetizan noradrenalina y adrenalina como respuesta a diversas

formas de estrés, como el ejercicio, la hipoglucemia, la hipovolemia por hemorragia, etc.

Esteroidogénesis

La corteza de las glándulas suprarrenales está compuesta por células esteroidogénicas, por ello es productora de hormonas, la misma se encuentra dividida en zonas, desde la parte más externa a la más interna: zona glomerular productora de mineralocorticoides, zona fascicular productora de glucocorticoides y la zona reticular que sintetiza andrógenos. Los trastornos adrenocorticales causan endocrinopatías tales como síndrome de Cushing, enfermedad de Addison, hiperaldosteronismo y los síndromes de hiperplasia suprarrenal congénita entre otras.

La producción de cortisol y andrógenos adrenales está regulada por el eje hipotálamo - hipofiso - adrenal, principalmente a través de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), aunque también participan otros factores producidos dentro de las suprarrenales. Asimismo, la ACTH es regulada por el hipotálamo y el sistema nervioso central mediante la hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Ver apartado Regulación de la secreción más adelante).

Las hormonas más importantes sintetizadas por la corteza adrenal son el cortisol y corticosterona (zona fascicular), la aldosterona, desoxicorticosterona [DOC] (zona glomerular), los precursores de andrógenos DHEA, DHEAS, androstenediona y una pequeña cantidad de testosterona (zona reticular), todos derivados del colesterol, por lo que poseen una estructura común, la del ciclopentanoperhidrofenantreno (⁸⁻). La conversión del colesterol en la síntesis esteroidogénica suprarrenal se ha esclarecido mediante el análisis de las enzimas esteroidogénicas. Casi todas estas enzimas pertenecen a la familia de las citocromo P450 oxigenasas (ver figura 2 y tabla 1).

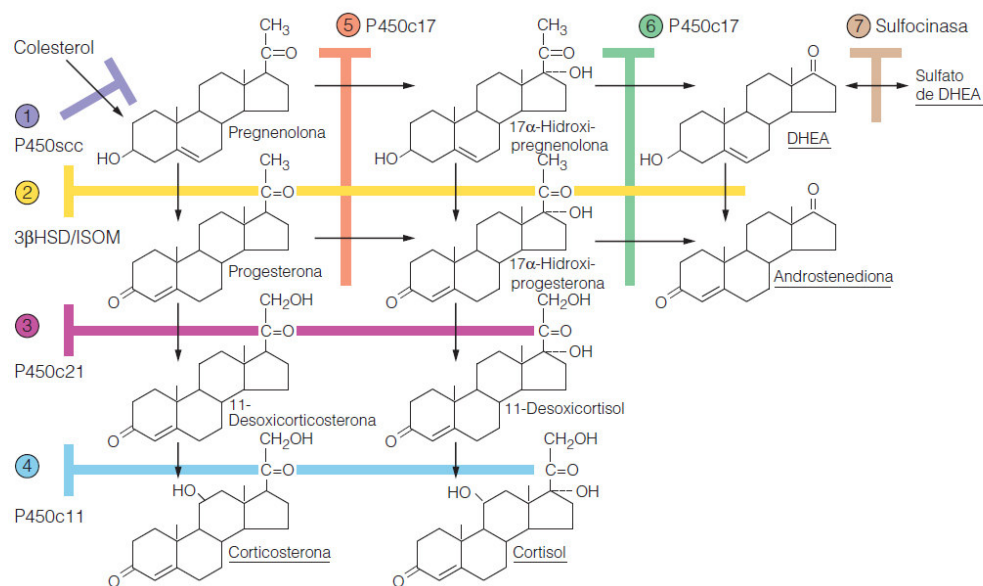


Figura 2. Biosíntesis de esteroides en la zona fasciculada y la zona reticular de la corteza suprarrenal. Ref. ① Colesterol desmolasa; ② 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; ③ 21α-hidroxilasa; ④ 11β-hidroxilasa; ⑤ 17α-hidroxilasa; ⑥ 17,20-liasa/desmolasa; ⑦ Sulfocinasa. D. G Gardner y D. Shoback *Endocrinología básica y clínica*, 9º ed. (2012).

Metabolismo del colesterol

Como se mencionó anteriormente, el colesterol es el precursor de la esteroidogénesis suprarrenal, este proviene principalmente de la circulación, en forma de colesterol de baja densidad unido a lipoproteínas (LDL). La captación se produce debido a que la superficie de las células presentes en el tejido suprarrenal poseen receptores específicos de LDL; el LDL es entonces internalizado a través de endocitosis mediada por receptores, las vesículas se fusionan con lisozimas y el colesterol libre se produce después de hidrolizarse. Sin embargo, está claro que esta no puede ser la única fuente, ya que en pacientes con niveles indetectables de LDL o con defectos en los receptores de LDL todavía presentan esteroidogénesis suprarrenal basal normal, El colesterol puede ser generado de novo dentro de la corteza suprarrenal a partir de acetil coenzima A (Acetil-CoA). Además, existe evidencia que la glándula suprarrenal puede utilizar colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) después de la absorción a través del receptor de HDL, SR-B1 (5-).

El paso que limita la esteroidogénesis adrenal es el transporte del colesterol intracelular desde la membrana mitocondrial externa a la interna, mediado por la proteína reguladora aguda esteroidogénica o en inglés Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR), algunos autores, en cambio, consideran que el paso limitante es la conversión del colesterol a pregnenolona (⁴). Luego se produce la conversión de colesterol en pregnenolona por la enzima de escisión de la cadena lateral del citocromo P450_{sc} (Colesterol desmolasa, CYP11A1) (Ver figura 3). Las mutaciones humanas que ocurren naturalmente han confirmado la importancia de la proteína StAR ya que estas dan como resultado hiperplasia suprarrenal lipoide congénita, con graves deficiencias en la producción de cortisol y aldosterona al momento del nacimiento. StAR es inducida por un aumento del monofosfato de adenosina cíclico intracelular (AMPc) después de la unión de ACTH a su receptor afín (⁸).

En la mitocondria, luego que se escinde la cadena lateral de colesterol, este se convierte en pregnenolona que es el sustrato base para la diferenciación en cada esteroide.

La glándula adrenal sintetiza varias hormonas por medio de tres vías, las cuales se resumen en la figura 3, para la biosíntesis se requieren dos superfamilias de enzimas, familia citocromo P450 que se comportan como hidroxilasas, liasas (desmolasa), oxidasas y aromatasas; las enzimas del tipo I del citocromo P450 (CYP) mitocondrial (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2) requieren transferencia de electrones a través de adrenodoxina reductasa (ADR) y adrenodoxina (Adx). Las enzimas microsomales CYP tipo II (CYP17A1, CYP21A2) reciben electrones de P450 oxidorreductasa. La otra familia es la de hidroxisteroides deshidrogenasas (HSD) (Ver tabla 1).

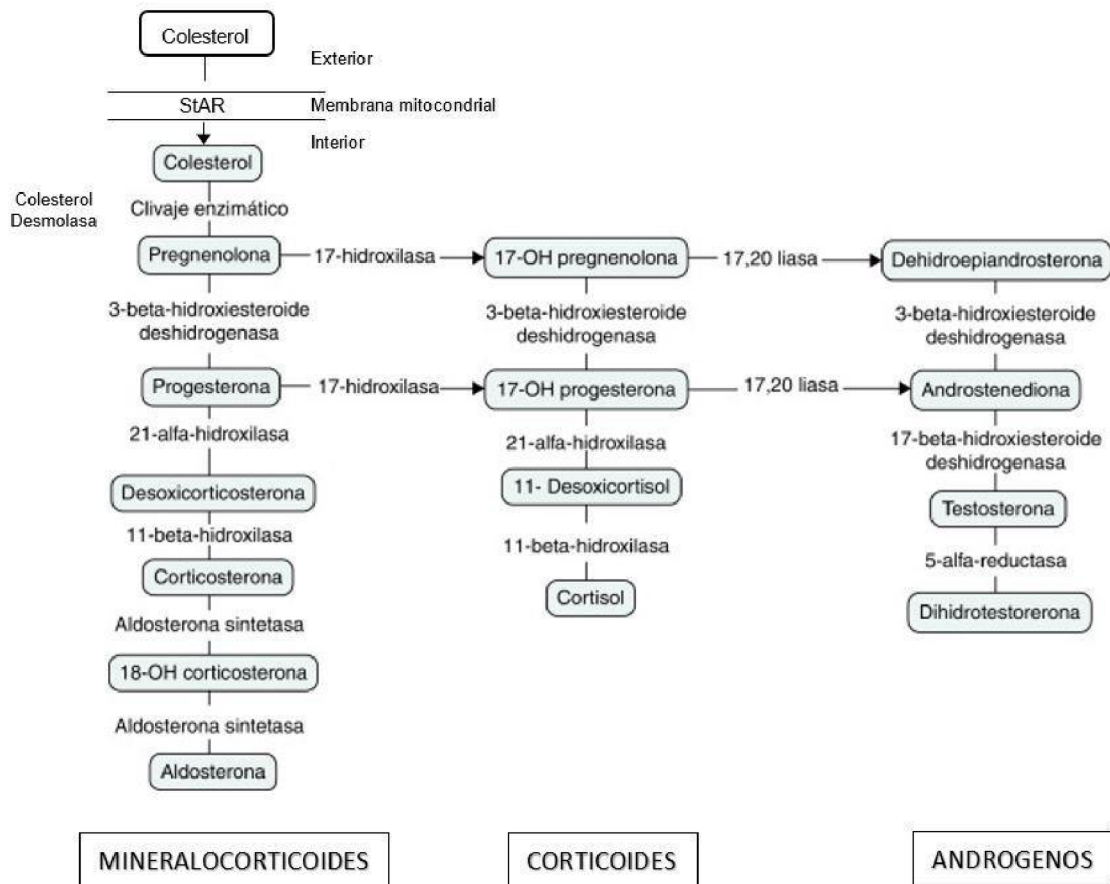


Figura 3. Síntesis de esteroides. Tomado y adaptado de: Lambert. *A practical approach to ambiguous genitalia in the newborn period.* (6. 196) *Urol Clin North Am.*, 37 (2010).

| Nomenclatura de enzimas esteroifogénicas y sus genes | | | |
|---|---|---------|--|
| Nombre de la enzima | Familia | Gen | Actividad enzimática |
| P450 _{sc} | Citocromo P450 tipo I | CYP11A1 | Colesterol-20,22-desmolasa |
| 3β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD)/ isomerasa (SDR) | Deshidrogenasas de cadena corta/reductasas superfamilia (SDR) | HSD3B2 | 3β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa |
| P450 _{c17} | Citocromo P450 tipo II | CYP17A1 | 17α-hidroxilasa, 17,20-liasa |
| P450 _{c21} | Citocromo P450 tipo II | CYP21A2 | 21-Hidroxilasa |
| P450 _{c11} | Citocromo P450 tipo I | CYP11B1 | 11β-Hidroxilasa |
| P450 _{aldo} | Citocromo P450 tipo I | CYP11B2 | Aldosterona sintetasa: 11β-hidroxilasa, 18-hidroxilasa, 18-oxidasa |

Tabla 1. Nomenclatura de las enzimas esteroideogénicas suprarrenales, sus genes y localización cromosómica. Tomado y adaptado de Williams. *Tratado de endocrinología*. 13ª ed. (2017).

Síntesis de Glucocorticoides

La hormona ACTH es el principal estímulo para la biosíntesis y secreción de glucocorticoides, el más importante de ellos es el cortisol. La síntesis de cortisol en primer lugar está mediada por la enzima 17α -hidroxilasa (CYP17A1), dentro del retículo endoplasmático liso da lugar a la 17α -hidroxilación de la pregnenolona para formar la 17α -hidroxipregnenolona, a continuación, esta es convertida en 17OHP posterior a la transformación de su doble enlace 5,6 en un doble enlace 4,5 por el complejo enzimático 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Una vía de menor importancia en las zonas fasciculada y reticular es la de convertir pregnenolona a progesterona mediante la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, y luego la progesterona pasa a 17OHP por intermedio de la 17α -hidroxilasa (ver figura 3).

El siguiente paso es microsómico, consiste en la 21-hidroxilación de CYP21A2 de la 17OHP para formar 11-desoxicortisol; que se hidroxila nuevamente dentro de las mitocondrias mediante 11β -hidroxilación (CYP11B1) para formar cortisol. Las zonas fasciculada y reticular también producen 11-DOC, 18-hidroxidesoxicorticosterona y corticosterona. No obstante, la falta de la enzima mitocondrial CYP11B2 (Aldosterona sintasa) evita la producción de aldosterona en dichas zonas de la corteza suprarrenal (²).

Síntesis de andrógenos

La zona reticular se distingue de la fascicular en varios aspectos importantes relacionados con la actividad de las enzimas esteroidogénicas. En primer lugar, la 3β -HSD se expresa en mucha menor cantidad en la zona reticular que en la fascicular, de forma que en esta zona predomina la «vía 5Δ ». En segundo lugar, la zona reticular expresa cofactores o condiciones que inducen la función 17,20-liasa de CYP17, lo que genera la molécula precursora de andrógenos de 19 carbonos deshidroepiandrosterona (DHEA) a partir de la 17-hidroxipregnenolona. Además, la zona reticular expresa DHEA sulfotransferasa (gen SULT2A1), que convierte DHEA en su conjugado sulfato, sulfato de DHEA (DHEAS). En la zona reticular se elabora también una cantidad limitada del andrógeno $\Delta 4$ androstenodiona mediado por CYP17. Aunque en la corteza suprarrenal humana sana se producen pequeñas cantidades de andrógenos potentes (p.

ej., testosterona) o estrógenos de 18 carbonos, la mayoría de los esteroides sexuales activos se producen mediante la conversión periférica de DHEAS y androstenodiona.

Regulación de la secreción

La ACTH es la hormona trófica de las zonas fasciculada y reticular, y el principal regulador de la producción de cortisol y de andrógenos suprarrenales, aunque también participan otros factores producidos dentro de las suprarrenales, incluso neurotransmisores, neuropéptidos y óxido nítrico. A su vez, la ACTH es regulada por el hipotálamo y el sistema nervioso central por medio de la hormona liberadora de corticotropina (CRH). La ACTH aumenta la síntesis de RNA, DNA y proteínas. La estimulación crónica lleva a hiperplasia e hipertrofia adrenocorticales; por el contrario, la falta de ACTH causa esteroidogénesis disminuida y atrofia adrenocortical. Es de destacar que la secreción de glucocorticoides ejerce una retroalimentación negativa sobre CRH y ACTH (ver figura 4).

La secreción de ACTH muestra un prominente patrón diurno, con un máximo a primeras horas de la mañana y un valle a última hora de la tarde. Además, la secreción de CRH, y por lo tanto de ACTH, es pulsátil. Existen múltiples reguladores para el eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (HHS), varios de ellos son mediados por el SNC (Control neuroendocrino). Muchos tipos de estrés, tanto neurogénico (p. ej., el miedo) como sistémico (p. ej., una infección), estimulan la secreción de ACTH. Los efectos del estrés vienen mediados por CRH y ADH y el SNC. En respuesta a muchas formas de estrés intenso puede persistir la secreción de ACTH a pesar de la retroalimentación negativa originada por las elevadas concentraciones de cortisol. Esto quiere decir que el hipotálamo tiene la capacidad de reajustar el “punto de ajuste” del eje HHS como respuesta al estrés (ver figura 4).

La ACTH actúa uniéndose a receptores de membrana plasmática, esto activa la adenilato ciclasa y aumenta el AMP cíclico, que a su vez activa fosfoproteínaa cinasas intracelulares, incluso la StAR. La acción de la ACTH incrementa la formación de colesterol libre, así como un incremento de la captación de lipoproteínas por la corteza suprarrenal. Este proceso estimula el suministro de colesterol a la enzima que divide la

cadena lateral (P450_{scc} o CYP11A1) para la conversión en Δ^5 -pregnenolona, lo que inicia la esteroidogénesis (ver figura 5).

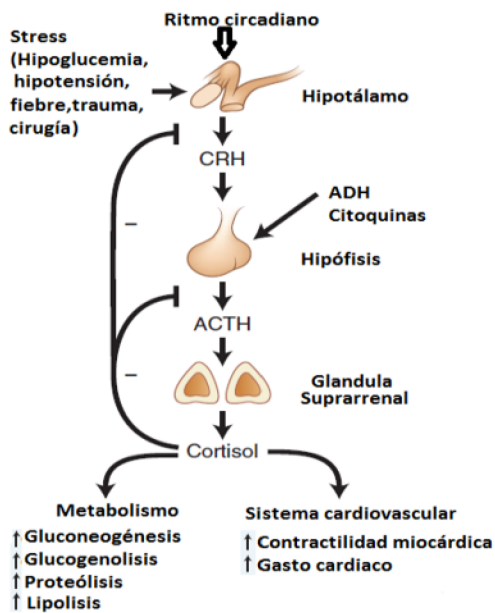


Figura 4. Regulación normal por retroalimentación negativa del cortisol. Adaptado de Williams. *Textbook of endocrinology* (p. 488) 14th ed. (2020).

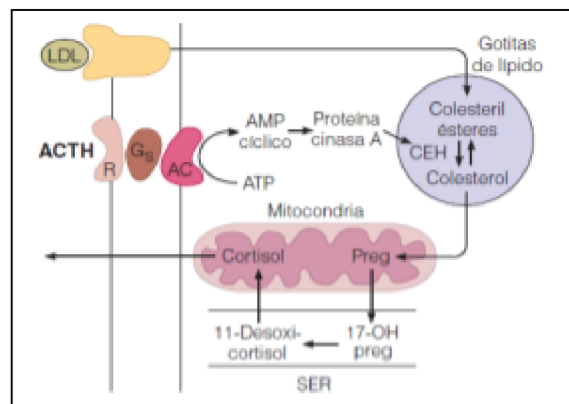


Figura 5. Mecanismo de acción de la ACTH sobre las células secretoras de cortisol en las dos zonas internas de la corteza suprarrenal. D. G Gardner y D. Shoback *Endocrinología básica y clínica*, 9^o ed. (2012).

| Vía | Zona | Estímulo | Hormona | Consecuencia |
|--------------------|------------|----------------------|--------------|--|
| Mineralocorticoide | Glomerular | Hiperpotasemia | Aldosterona | Aumenta sodio y agua |
| | | Hiponatremia | | Disminuye potasio |
| | | Angiotensina II | | Aumenta volemia y presión arterial |
| Glucocorticoide | Fascicular | Descarga simpática | Cortisol | Aumenta glucemia |
| | | ACTH | | Disminuye respuesta inmune Antiinflamatorio Aumenta función cardíaca Aumenta la tasa de filtración glomerular Disminuye secreción Aumenta ADH |
| Andrógenos | Reticular | Hormona luteinizante | DHEA | Desarrollo de caracteres sexuales secundarios masculinos |
| | | ACTH | Testosterona | |

Tabla 2. Estímulos y síntesis de esteroides. Latorre, et al, Hiperplasia adrenal congénita por déficit de 21 hidroxilasa: un reto diagnóstico y terapéutico. *Revista repertorio de medicina y cirugía*. (p. 82). (2016).

Síntesis de aldosterona

La zona glomerular, produce el mineralocorticoide aldosterona, que regula la homeostasia de la sal y el volumen. La zona glomerular está poco influida por la ACTH, y se regula principalmente por el sistema renina-angiotensina, la $[K^+]$ sérica y el péptido natriurético auricular (ANP) ⁽⁶⁾. La secreción de aldosterona y sus metabolitos intermedios 18-hidroxilados están restringidos a la zona glomerular debido a la expresión específica de P450 11B2 (aldosterona sintasa) en esta zona.

La angiotensina II y el potasio estimulan la secreción de aldosterona principalmente aumentando la transcripción de CYP11B2 a través de vías de señalización intracelular comunes. Elementos de respuesta de cAMP en la región 5' del gen CYP11B2 se activan después de un aumento de Ca^{2+} intracelular y activación de calmodulina quinasa. El efecto del potasio está mediado por la despolarización de la membrana y apertura de los canales de calcio y el efecto de la angiotensina II después de la unión de angiotensina II al receptor AT1 de superficie y activación de la fosfolipasa C.

En cambio, el efecto de ACTH es modesto y difiere en situaciones crónicas o agudas. Un bolo de ACTH aumentará la secreción de aldosterona, principalmente estimulando las vías tempranas de la esteroidogénesis suprarrenal, pero el nivel circulante de aldosterona no aumentará más un 10% o 20% por encima de los valores de referencia. La ACTH no tiene ningún efecto sobre la transcripción del gen CYP11B2 o sobre la actividad enzimática. Además la estimulación crónica y continua con ACTH no tiene efecto sobre la producción de aldosterona, o al menos no posee efecto inhibitorio ⁽⁸⁾.

Hiperplasia suprarrenal congénita

La HSC es la enfermedad endocrina congénita más común, se debe a diversas metabolopatías hereditarias autosómicas recesivas, caracterizadas por la deficiencia o la ausencia total de una enzima concreta implicada en la biosíntesis de los esteroides corticales, sobre todo cortisol.

Los precursores de esteroides implicados en las vías esteroideogénicas defectuosas son derivados a otras vías, dando lugar a un aumento en la producción de andrógenos, lo que provoca virilización.

Ciertos defectos enzimáticos también afectan la secreción de aldosterona, en consecuencia se añaden pérdidas salinas al síndrome de virilización.

Debido al déficit de cortisol no se realiza el feedback (-) a nivel central, motivo por el cual los niveles de CRH y ACTH estarán aumentados y por este motivo también aumentado el tamaño de las glándulas.

Déficit de 21-hidroxilasa

Por mucho, la causa más frecuente de HSC es el déficit de 21-hidroxilasa (más del 90%) que resulta de mutaciones en el gen CYP21A2. La 21-hidroxilasa está involucrada en la biosíntesis de cortisol y aldosterona, por tanto, en la HSC habrá déficit de cortisol, aldosterona y aumento anormal de andrógenos. Existen diferentes fenotipos de la enfermedad que dependen de la severidad del defecto enzimático. La HSC por déficit de 21-hidroxilasa puede clasificarse en: clásica virilizante y perdedora de sal, clásica virilizante simple y no clásica, como muestra la figura 6.

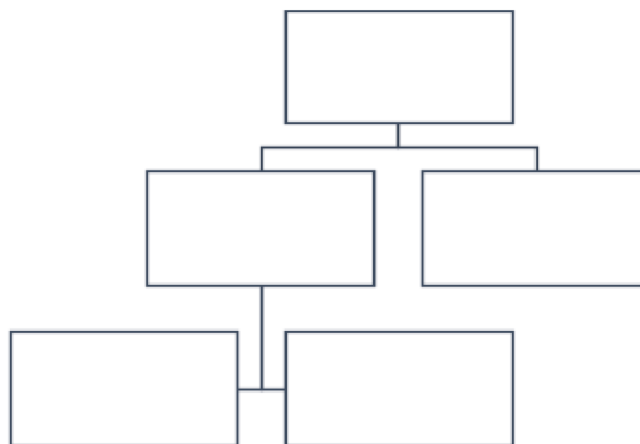


Figura 6. Clasificación de la HSC.

Las mutaciones de CYP21A2 pueden clasificarse en tres categorías según el nivel de actividad enzimática predicha a partir de la mutagénesis in vitro y los estudios de expresión, definiendo el fenotipo para cada tipo de mutación. Sin embargo la correlación genotipo-fenotipo no siempre es estricta (10). La clasificación de las mutaciones según el nivel de actividad enzimática son las siguientes:

- Deleciones y mutaciones sin sentido: actividad enzimática ~ 0 % → Virilizante y perdedora de sal.
- Mutaciones puntuales: actividad enzimática ~ 1-2 % → Virilizante simple.
- Mutaciones puntuales: actividad enzimática ~ 20-60 % → No clásica.

Manifestaciones clínicas

HSC virilizante simple: desde el nacimiento, se presentan alteraciones en la morfogénesis genital a causa de un hiperandrogenismo en el feto desde la séptima semana de vida intrauterina. Los recién nacidos de género femenino presentan virilización de los genitales externos en diferentes grados y se clasifican según la escala de Prader, la cual se numera de grados I-V: I) clitoromegalia sin fusión labial; II) fusión posterior de labios; III) mayor clitoromegalia con orificio urogenital perineal y fusión labial casi completa; IV) clítoris fálico, orificio urogenital en base del clítoris y fusión labial completa y V) clítoris con forma peneal, orificio uretral en punta del falo y labios totalmente unificados con aspecto de escroto, puede presentar uretra oculta dentro del falo y causar confusión con un paciente masculino con criptorquidia bilateral e hipospadias. La presencia de genitales ambiguos no confirma el diagnóstico por lo cual se debe tener en cuenta otras enfermedades que puedan cursar con esta presentación.

En contraste, en los hombres es más difícil identificar la enfermedad al nacimiento ya que los signos clínicos son muy sutiles, presentando hiperpigmentación melánica del escroto por aumento de la hormona melanocítico-estimulante y pene más grande de lo normal, signos que en conjunto se denominan macrogenitosomía, estos signos después se asocian con pubertad precoz. Las mujeres manifestarán además de pubertad precoz,

hirsutismo, oligomenorrea o amenorrea, ovarios poliquísticos y acné. En ambos sexos se presentará crecimiento acelerado y baja estatura final por cierre prematuro de las epífisis óseas (16-).

HSC con pérdidas salinas: presenta manifestaciones clínicas desde el nacimiento. Debido a la actividad enzimática nula y deficiencia total de aldosterona se observa un trastorno hidroelectrolítico por incapacidad de retener sodio, agua y excretar potasio, resultando en una crisis adrenal, es decir, una deficiencia de aldosterona sintomática, que se define como un episodio de hiperpotasemia, hiponatremia y acidosis metabólica manifestada con inapetencia, letargia, vómito, diarrea, poliuria, deshidratación, pérdida de peso, hipotensión y choque hipovolémico. De no ser tratada esta variante clínica puede llevar a la muerte en pocas horas (16-).

Además, las concentraciones elevadas de 17OHP actúan como antagonista de mineralocorticoides, exacerbando así los efectos del déficit de aldosterona por sus efectos natriuréticos los cuales se evidencian de la primera a la cuarta semana de vida extrauterina.

HSC no clásica: en esta presentación los pacientes muestran concentraciones normales de cortisol y exceso de andrógenos, pero sin deficiencia de aldosterona. Las manifestaciones clínicas pueden aparecer cualquier momento de la vida y corresponden a grados variables de pubarquia precoz (presencia de vello púbico, vello axilar y olor apocrino antes de los 8 años en niñas y 9 años en niños), hirsutismo (crecimiento excesivo de vello terminal en la mujer siguiendo un patrón de distribución masculino), acné quístico, hipertrofia del clítoris, aceleración del crecimiento y de la maduración ósea, irregularidades menstruales y ovario poliquístico. En hombres calvicie, oligospermia e infertilidad (16-).

Tratamiento médico

Se basa en la terapia de remplazo hormonal con glucocorticoides en pacientes con HSC clásica y la forma sintomática de la HSC no clásica; en aquellos con pérdidas salinas se

deben añadir mineralocorticoides, suprimiendo así por retroalimentación negativa la secreción de CRH y ACTH y por ende, la estimulación suprarrenal (¹⁶).

En madres gestantes de un feto con riesgo de tener HSC se debe iniciar el tratamiento con el fin de reducir la virilización femenina y por tanto la necesidad de cirugía reconstructiva. Debido a que los genitales externos son virilizables desde la octava semana de gestación y el diagnóstico por biopsia de vellosidades coriónicas solo se puede realizar desde la duodécima semana, el tratamiento debe iniciarse en forma empírica tan pronto como se confirme el embarazo. Una vez se realice la biopsia y se confirme o descarte la enfermedad, se decide si continuar o no con el tratamiento.

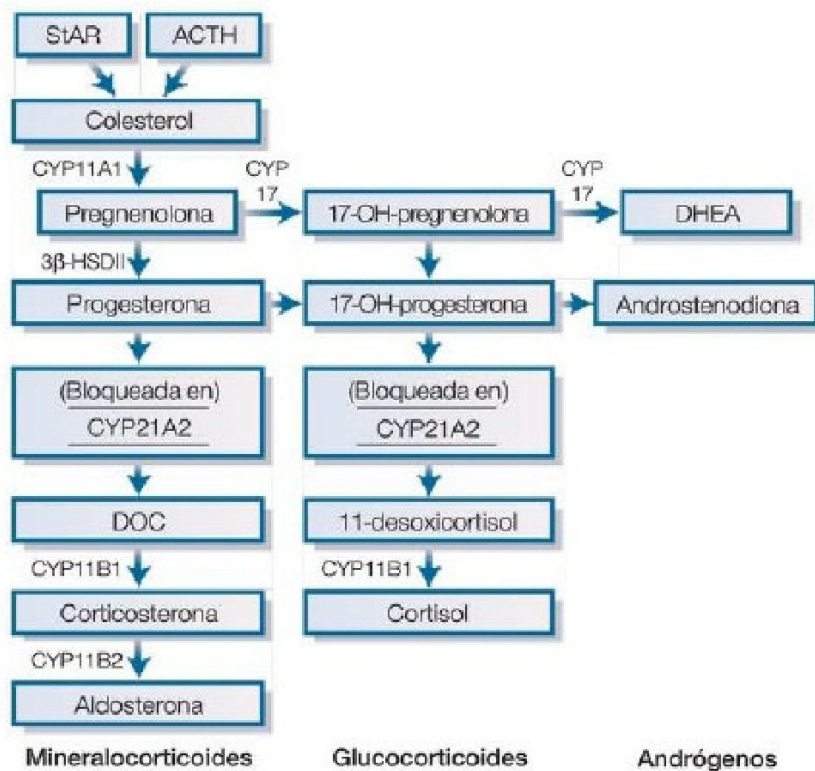


Figura 7. Hiperplasia suprarrenal congénita relacionada con déficit de 21 α - hidroxilasa. Williams. (2017). Tratado de endocrinología .13° ed. Elsevier.

Déficit de 11 β – hidroxilasa

El déficit de 11 β -hidroxilasa es la segunda causa más frecuente de hiperplasia suprarrenal congénita (HSC), es ocasionada por mutaciones en el gen CYP11B1, produce disminución en la producción de cortisol, incremento en la secreción de ACTH

y acumulación de 11-desoxicorticosterona y andrógenos suprarrenales, que pueden producir hipertensión arterial e hiperandrogenismo, respectivamente.

En el déficit severo la clínica es precoz, con virilización de los genitales externos de las niñas por incremento de DHEA que luego se transforma en testosterona, los pacientes presentan gónadas y genitales internos femeninos normales, en los niños se observa aumento del tamaño peneano. Otras manifestaciones son hiponatremia, hiperpotasemia, pseudohermafroditismo en el hombre con fenotipo femenino debido a que no se expresa la enzima 3β - HSD2 en los testículos. En otros casos, el hiperandrogenismo se manifiesta posnatalmente, como pubarquia precoz y rápido crecimiento somático, con aceleración de la maduración esquelética. Esta maduración somática puede desencadenar una pubertad precoz, la cual conlleva el cierre prematuro de las epífisis. Todo ello explica que la talla baja final sea habitual en estos pacientes (¹²).

Para corregir el déficit corticoideo existente y suprimir la producción excesiva de andrógenos, se administran corticoides a dosis sustitutivas. El exceso de corticoides interfiere en el crecimiento, de forma dosis-dependiente y multifactorial, por lo que se debe ajustar periódicamente su dosificación, consiguiendo la normalización de los niveles de andrógenos (SDHEA, androstenodiona y testosterona), inicialmente elevados.

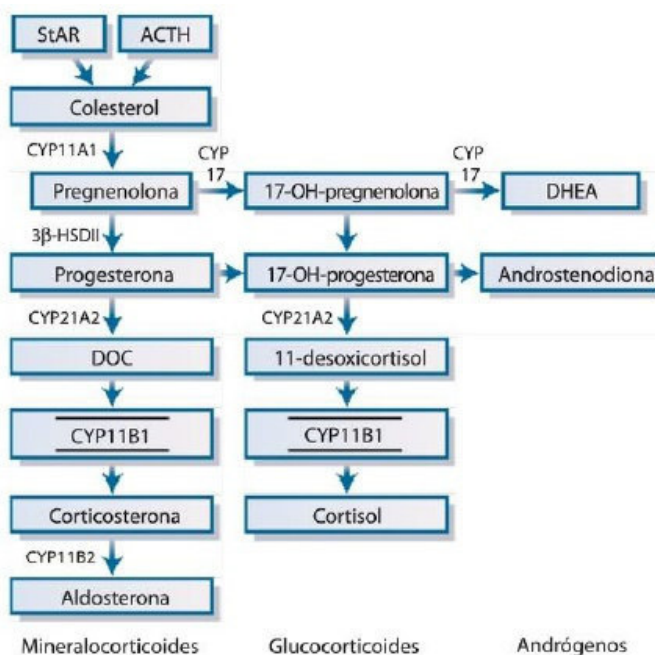


Figura 8. Hiperplasia suprarrenal congénita relacionada con el déficit de 11β -hidroxilasa. Williams. (2017). Tratado de endocrinología. 13ª ed. Elsevier.

Otros déficits enzimáticos

Otros déficits enzimáticos que afectan a las glándulas adrenales menos frecuentes y no relacionados con el presente trabajo son: déficit de 17 α – hidroxilasa, déficit de 3 β – hidroxisteroide deshidrogenasa, déficit de la proteína StAR, déficit de cortisona reductasa.

Diagnóstico

Las patologías endocrinológicas adrenales más frecuentes, como se mencionó anteriormente, se encuentran asociadas a alteraciones de las vías esteroidogénicas. A nivel clínico es posible el dosaje de distintos metabolitos y la realización de pruebas diagnósticas, entre las que se pueden mencionar las siguientes: determinación plasmática de cortisol y andrógenos adrenales, medición de cortisol libre en orina de 24 hs, cortisol salival, concentración de ACTH plasmática, pruebas de suspensión con dexametasona y dosaje 17OHP, en este último metabolito se basa el desarrollo metodológico del presente trabajo.

Pesquisa de HSC

La provincia de Buenos Aires posee un programa destinado a la pesquisa neonatal de enfermedades congénitas, este programa se denomina PRODYTEC y es definido por el Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires como: “PRODYTEC es un programa destinado a dar cumplimiento a la ley 13905/08, que declara obligatoria en la provincia de Buenos Aires la detección de enfermedades congénitas del recién nacido mediante un procedimiento de pesquisa masiva con el fin de lograr un diagnóstico precoz y tratamiento oportuno. La presente ley contempla la investigación de las siguientes enfermedades: hipotiroidismo congénito, fenilcetonuria, galactosemia,

hiperplasia suprarrenal congénita, déficit de biotinidasa, fibrosis quística y leucinosi o enfermedad de jarabe de arce” (9).

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. 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. Es ésta una práctica que constituye una pieza fundamental de la Medicina Preventiva. Por definición la Pesquisa Neonatal es parte de la Atención Primaria de la Salud Pública, siendo un derecho de todos los recién nacidos acceder a este tipo de Programas. (10).

Para HSC el Laboratorio de Endocrinología del Hospital de Niños “Sor María Ludovica” es Centro de Referencia para la Confirmación y Seguimiento de la patología. Para la confirmación del diagnóstico y el posterior control del tratamiento, se utiliza el dosaje de 17OHP por RIA.

Importancia del dosaje de 17OHP

Clínicamente el dosaje de 17OHP permite evaluar alteraciones de las vías metabólicas en las glándulas suprarrenales. Dentro de las alteraciones, la patología endocrina suprarrenal más frecuente en niños es la Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC), Particularmente la deficiencia de la enzima 21 α -hidroxilasa (P450c21) es la principal causa, dicha patología presenta valores elevados de 17OHP, el dosaje de este metabolito posee valor diagnóstico en niños. Además posee otros usos de importancia clínica.

Las aplicaciones clínicas del dosaje de 17OHP son:

- Diagnóstico de HSC.
- Diagnóstico de Hiperplasia Suprarrenal de comienzo tardío.

- Control del tratamiento en niños con HSC.
- Evaluación del paciente con síntomas de virilización como acné, hirsutismo, alopecia androgénica, infertilidad.
- Medir la actividad progestacional del cuerpo lúteo durante el embarazo.

Se debe tener en cuenta que el suero de niños recién nacidos y menores de 6 meses posee valores elevados de la sulfato de 17 OH-Pregnenolona, provenientes de la corteza fetal, esto puede causar interferencia con el dosaje de 17OHP dando resultados falsos positivos, por este motivo se recomienda la extracción con éter previo al ensayo.

Valores de referencia

Con extracción

0 – 1 mes: No detectable - 5,75 ng/mL

1 - 2 meses: 0,12 – 3,8 ng/mL

2 - 6 meses: 0,10 – 2,8 ng/mL

Sin extracción

6 – 12 meses Niñas: 0,10 – 2,0 ng/mL Niños: 0,10 – 0,95 ng/mL

1 – 5 años 0,25 – 0,60 ng/mL

5 – 8 años 0,33 – 1,2 ng/mL

> 8 años 0,55 – 1,6 ng/mL

5. Objetivos

Se plantea como hipótesis que el reemplazo del método utilizado actualmente, radioinmunoensayo (RIA) para la determinación de 17OHP en suero humano y plasma “RIA 17 α -hydroxyprogesterone” de la marca BECKMAN COULTER, por un nuevo método de quimioluminiscencia “17 OH Progesterone (CLIA)”, en una plataforma

automatizada MAGLUMI ® Snibe, aportaría resultados estadísticamente equivalentes, asegurando la utilidad clínica de los mismos.

Para la verificación de esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Correlacionar dos métodos de dosaje de 17OHP in vitro utilizando muestras de pacientes a partir de la introducción en el mercado de un nuevo método analítico.

Objetivos específicos:

1-Determinar el sesgo entre los dos métodos.

2-Analizar la correlación y la concordancia entre las dos metodologías y determinar si los resultados son equivalentes desde el punto de vista clínico.

3-Evaluar posible modificación en el intervalo de referencia del analito a estudiar, teniendo en cuenta la variación que se introduce a un método ya normalizado.

6. Materiales y métodos

Este trabajo se enmarca en el área de salud de endocrinología en el Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría Sor María Ludovica. El tipo de estudio es observacional, correlacional, transversal, cuantitativo y de carácter retrospectivo.

Materiales esenciales:

- Muestras de suero de pacientes.
- Sistema de inmunoensayo por quimioluminiscencia Maglumi ® 600 de Snibe

- Contador gamma alfa nuclear
- Reactivos “MAGLUMI 17 OH-Progesterone (CLIA)”
- Reactivos “RIA 17 α -hydroxyprogesterone” de BECKMAN COULTER
- Pipetas Automáticas
- Calibradores
- Software para el tratamiento estadístico.

Métodos de medición

Las determinaciones se realizaron por dos métodos:

Método 1: RIA 17 α -hydroxyprogesterone” de BECKMAN COULTER

Método 2: Sistema de inmunoensayo por quimioluminiscencia Maglumi ® 600 de Snibe

Nota por ensayo RIA: *El suero de los recién nacidos y lactantes (particularmente los de menores de 6 meses) tienen valores elevados de la sulfato de 17 OH-Pregnenolona. Se recomienda en este caso particular, la extracción con éter previo al ensayo de la 17OHP (4-).*

i. RIA

El radioinmunoensayo de 17 α -hidroxiprogesterona (17-OHP) es un ensayo competitivo que permite el dosaje de 17-OHP, puede ser utilizado en suero o en plasma con EDTA indirectamente, después de la extracción de la muestra con éter y evaporación del solvente, seguido de la resuspensión con el calibrador cero.

Las muestras de suero o plasma, los extractos, el control y los calibradores se incuban con el trazador ¹²⁵I 17OHP en tubos recubiertos con el anticuerpo. Después de la incubación se aspira el contenido de los tubos y estos se lavan para retirar el 17OHP marcado con ¹²⁵I pero no enlazado. Se determina la actividad enlazada mediante un contador gamma. Los valores desconocidos se determinan mediante interpolación con la curva estándar.

ii. Quimioluminiscencia Maglumi® 600

Es un inmunoensayo de quimioluminiscencia competitivo. La muestra (o calibrador o control, si corresponde), anticuerpos policlonales anti-17OHP, el marcador ABEI (pequeña molécula no enzimática derivada del isoluminol) se mezclan a fondo y se incuban a 37 C, luego se agrega la solución de microperlas magnéticas recubiertas con antígeno de 17OHP incubadas a 37°C. La muestra y las microperlas magnéticas recubiertas con el antígeno de 17OHP progesterona compiten por unirse al marcador ABEI, formando inmunocomplejos. Después de la precipitación en un campo magnético, se decanta el sobrenadante y luego se realiza un ciclo de lavado. Posteriormente, se agrega el iniciador 1 + 2 para comenzar una reacción quimioluminiscente. La señal luminosa se mide mediante un fotomultiplicador en 3 segundos como unidades relativas de luz (RLUS), que es inversamente proporcional a la concentración de 17OHP presente en la muestra (o calibrador / control, si aplica).

Software y plan de análisis estadístico

- Para la recolección de datos y el armado de base de datos se utilizó el programa Excel 2013. Con este programa también se elaboraron gráficos referidos a las muestras.
- Para análisis estadísticos y restantes gráficos se utilizaron los programas IBM SPSS Statistics versión 26 y MedCalc versión 20.015.
- Una vez recolectadas las muestras y realizadas las determinaciones de 17OHP, los datos se volcaron a una planilla de cálculo, posteriormente se hizo una descripción de los datos, se eliminaron valores erróneos o que no cumplían con el criterio establecido para este trabajo. Seguidamente se procedió a la búsqueda de valores aberrantes mediante el método descripto más adelante.
- A continuación, con el fin establecer si las muestras presentan una distribución normal se realizaron histogramas, estadísticos descriptivos, análisis de

normalidad (Shapiro-Wilk o test de Kolmogorov-Smirnov dependiendo de la cantidad de muestras) y gráficos Q-Q.

- El paso siguiente fue el análisis de la correlación entre ambos métodos, en el caso de distribución normal, se planteaba utilizar correlación de Pearson, en el caso que la distribución de los datos no fuera normal se planeaba utilizar correlación de Spearman.
- Luego se analizaron las medianas de ambos métodos con el test de Wilcoxon.
- Posteriormente se realizó análisis de las diferencias para evaluar la concordancia, mediante gráficos de Bland-Altman donde:

-En el eje de las ordenadas se representó la diferencia entre los dos métodos para cada muestra (Maglumi-RIA) o la diferencia relativa % (Maglumi-RIA).

En el eje de las abscisas se graficó el promedio de cada pareja de resultados obtenidas para cada una de las muestras. Además se graficó la media de las diferencias y los límites para el IC ± 1.96 SD.

Para el caso de análisis relativo %, en el eje de las abscisas se graficó el promedio de cada pareja de resultados obtenidas para cada una de las muestras. Además se graficó la media de las diferencias relativas, los límites para variabilidad biológica deseable, variabilidad biológica mínima y el IC ± 1.96 SD.

Los límites del sesgo para variabilidad biológica se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{Desviación deseable: } DMR < 0,25 (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$$

$$\text{Desviación mínima: } DMR < 0,375 (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$$

- Donde, CV_I : coeficiente de variación intraindividual; CV_G Coeficiente de variación grupal.

- Luego se calculó el CV, sesgo % y error total del equipo Maglumi ® 600 para el analito 17OHP a fin de evaluar su desempeño. Se emplearon las siguientes fórmulas:

$$CV = SD / m * 100$$

$$BIAS\% = m v / v * 100$$

$$ET\% = 1.65 * CV + \% BIAS$$

- Por último se realizó análisis de regresión lineal.

Evaluación de errores y valores aberrantes

Para identificar posibles resultados erróneos y valores aberrantes se utilizaron los siguientes criterios:

- No se aceptaran resultados si por alguno de los dos métodos a evaluar los resultados se encuentran fuera de los límites de detección y/o rango de medida indicado por el fabricante (RIA: 0,07 – 50 ng/mL; Maglumi: 0,1 – 20 ng/mL).
- Se aceptaran resultados si se cumplen con los criterios establecidos por el laboratorio para el control de calidad interno aplicado en la rutina.
- Se aceptaran como máximo un 2,5% de valores aberrantes detectados mediante herramientas estadísticas.

Procedimiento para detección de valores aberrantes inter-métodos

- Evaluar las diferencias absolutas entre métodos para cada muestra (DA).
- Evaluar la diferencia absoluta media entre ambos métodos (DAM).
- Establecer el valor límite del test (LT_E) multiplicando por 4 (cuatro) la diferencia absoluta media (DAM) entre ambos métodos.
- Comparar la DA para cada muestra con el LT_E .
- En el caso que la DA de una muestra exceda el LT_E se realizará un análisis adicional, pero normalizando los valores, calculando las diferencias absolutas

normalizadas (DAN) y la diferencia absoluta media normalizada entre métodos (DAMN).

- Establecer los límites de aceptación normalizados (LT_N) multiplicando por 4 (cuatro) la DAMN.
- Comparar la DAN para cada muestra con el LT_N .

Interpretación:

- Si ninguna muestra supera el LT_E se considera que no hay valores aberrantes inter-métodos. No es necesario el análisis normalizado.
- Si alguna muestra supera el LT_E del análisis absoluto, se realiza el análisis normalizado.
- Si una muestra supera el LT_E del análisis absoluto, pero no el normalizado se considera válida la muestra.
- Los puntos que no superen ambos test se consideran aberrantes.

Detección de valores aberrantes intra-métodos

- No se determinaron valores aberrantes intra-métodos dado que se acepta el criterio de control de calidad interno aplicado por el laboratorio.

7. Resultados

Muestras

A las muestras de niños menores de 6 meses se les realizó una extracción con éter previo al ensayo, las muestras de pacientes mayores de 6 meses fueron procesadas sin extracción previa.

De abril de 2020 a octubre de 2020 se procesaron en el Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría Sor María Ludovica 77 muestras de 67 pacientes con un

rango etario entre 0 y 30 años. La mayor parte de las muestras provenían de pacientes pediátricos, a excepción de 3 muestras de pacientes mayores de 18 años.

Las muestras se distribuían de la siguiente manera: 16 muestras (21%) pertenecen a pacientes de entre 0 a 5 años, 39 muestras (51%) procedían de pacientes de entre 6 a 10 años siendo este este rango etario el de mayor proporción, 15 muestras (19%) provenían de pacientes de 11 a 15 años y 7 muestras (9%) de mayores de 15 años (Ver gráfico 1 y 3). La mediana de edad fue 8 años con una media de 8,91 años (Ver tabla 3). En cuanto a la distribución por sexo, 58 muestras procesadas (75%) corresponden al sexo femenino y 19 muestras (25%) corresponden al género masculino (Ver gráfico 2 y 3).

Estadístico de las muestras por edad

| Edad | |
|---------|------|
| N | 77 |
| Media | 8,91 |
| Mediana | 8,00 |
| Mínimo | 0 |
| Máximo | 30 |

Tabla 3. Estadístico de las muestras por edades.

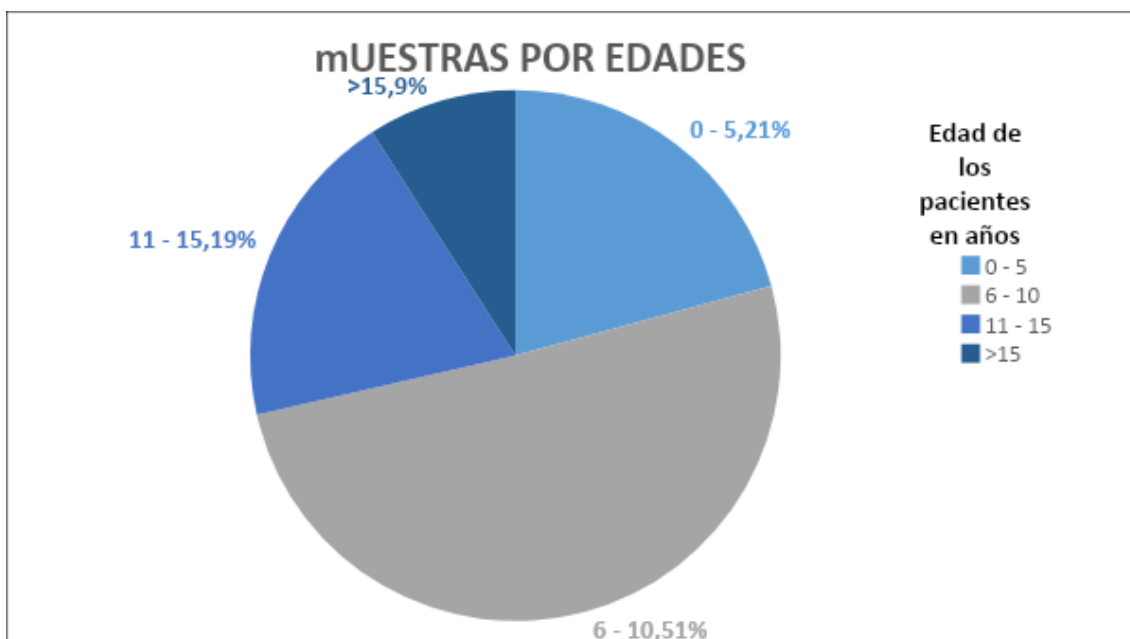


Gráfico 1. Muestras por edades en %.

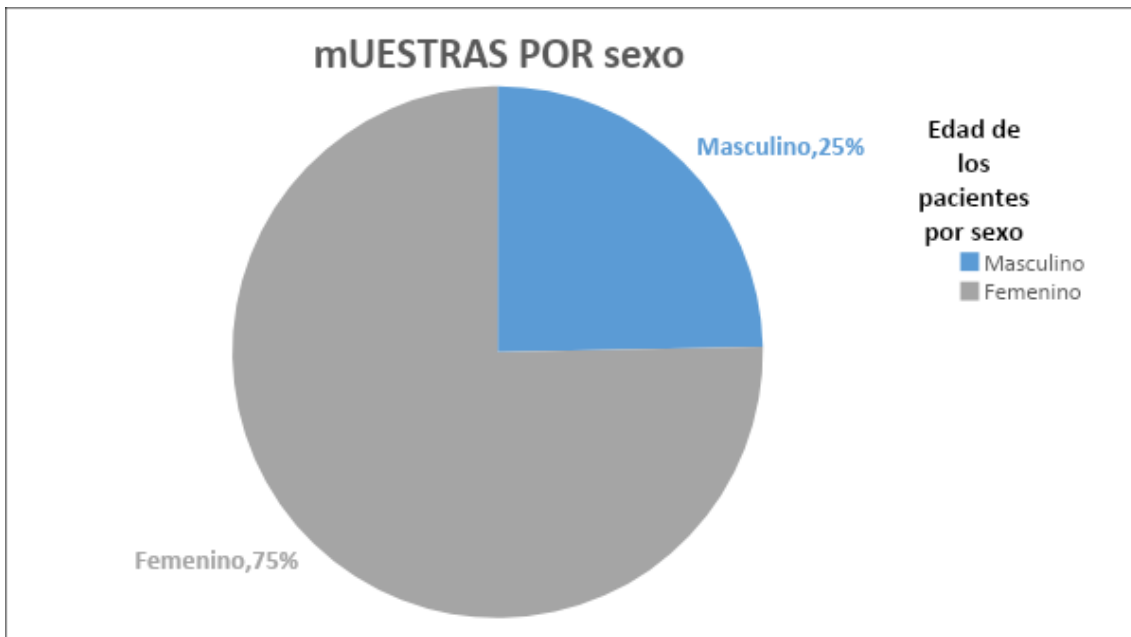


Grafico 2. Muestras por sexo en %.

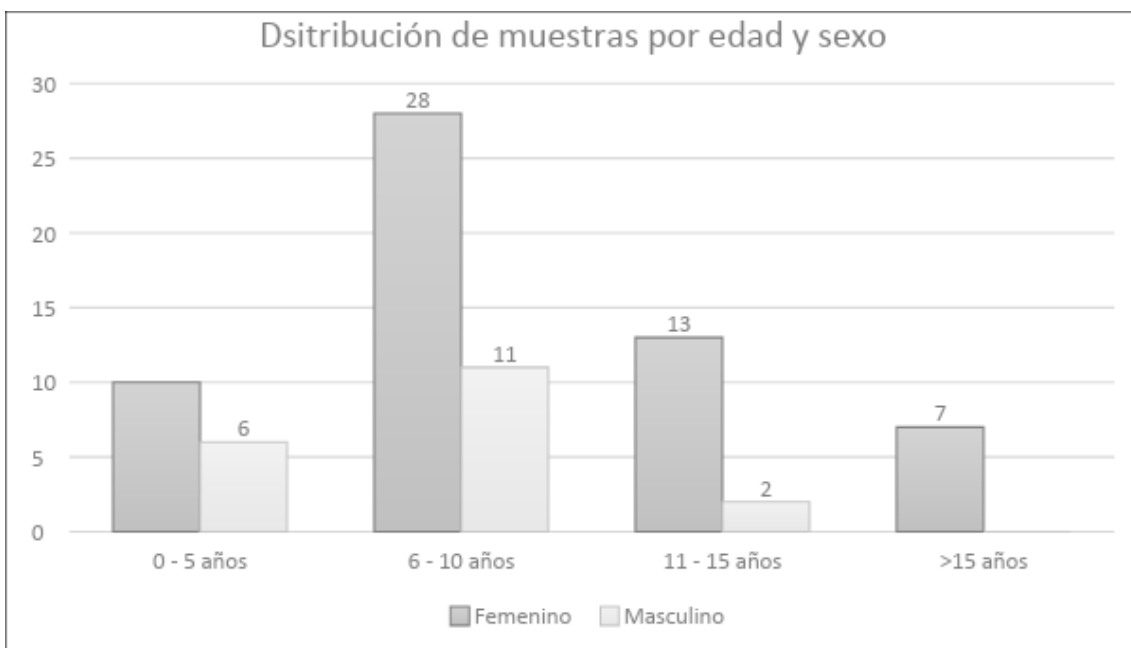


Grafico 3. Distribución de muestras por sexo y edad.

Análisis de los datos

Exclusión de muestras y detección de valores aberrantes o atípicos

Utilizando los criterios de identificación de errores y exclusión que se mencionaron anteriormente, se eliminaron 17 muestras cuyos resultados por alguno de los dos

métodos (o ambos) se encontraban fuera de los límites de detección o rango de medida.

Se continúa análisis con un N de 60 muestras.

| | |
|---------------------|----|
| Muestras aceptadas | 60 |
| Muestras eliminadas | 17 |

En cuanto a valores atípicos, se desarrolló la metodología descrita para su detección, se calculó el DA para cada muestra comparándolo contra el LT_E .

| | |
|---------------------|-------|
| DAM | 1,558 |
| $DAM*4 = LT_E$ | 6,230 |
| Muestras aceptadas | 60 |
| Muestras rechazadas | 0 |

Según el análisis absoluto no se rechaza ninguna muestra, por lo tanto, no es necesario el análisis normalizado. Muestras para análisis estadístico N=60.

| | |
|---|-----|
| Muestras aceptadas por análisis absoluto | 60 |
| Muestras aceptadas por análisis normalizado | N/A |
| Total muestras aceptadas | 60 |

A continuación se presentan los histogramas para la determinación de 17OHP por ambos métodos, de la observación de estos se puede inferir que la distribución no es normal (Gráficos 4 y 5). También se presentan las medidas de tendencia central (ver tabla 4).

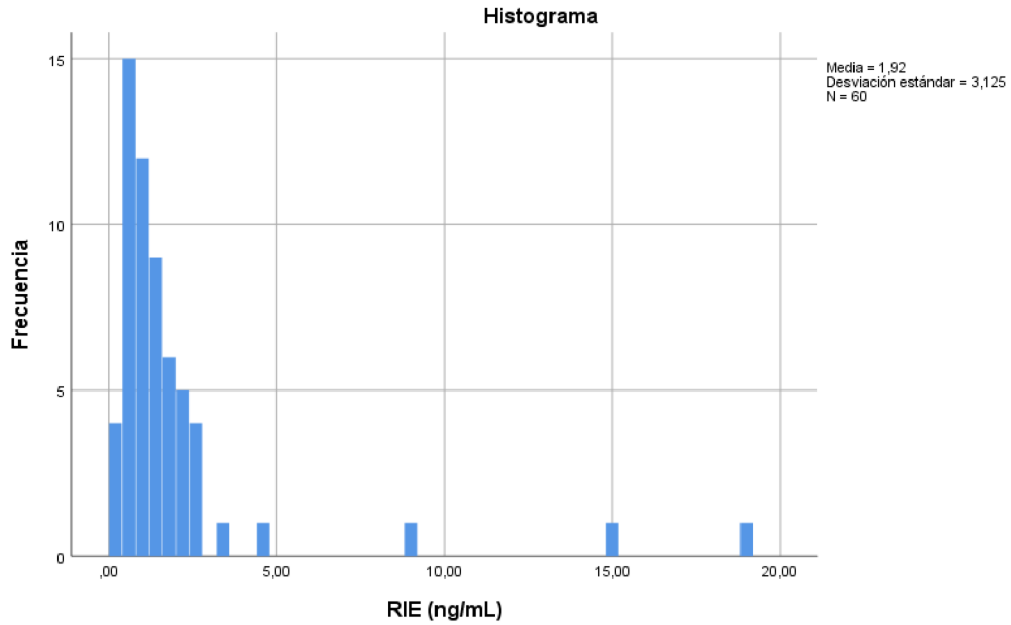


Grafico 4. Histograma RIA.

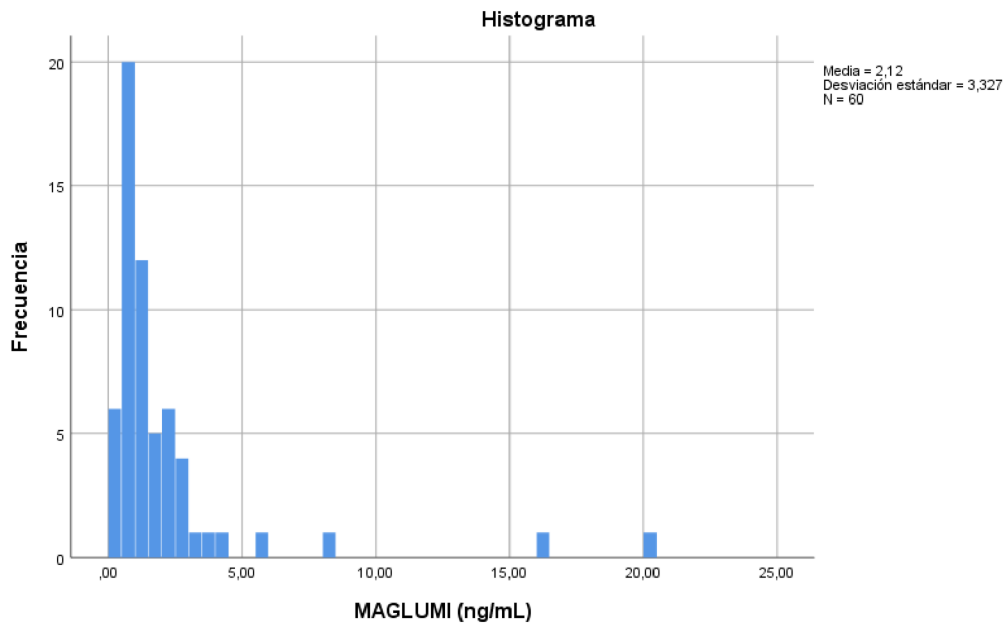


Grafico 5. Histograma MAGLUMI.

Descripción de las muestras (ng/mL)

| Método | Media | IC 95% para la media | Mediana | 1er cuartil | 3er cuartil |
|---------|-------|----------------------|---------|-------------|-------------|
| RIA | 1,92 | 1,12 - 2,73 | 1,10 | 0,65 | 1,90 |
| MAGLUMI | 2,12 | 1,26 - 2,98 | 1,21 | 0,76 | 2,21 |

Tabla 4. Descripción de las muestras.

Prueba de normalidad

Para confirmar lo inferido en los histogramas se realiza la prueba de normalidad de mediante el test de Kolmogorov-Smirnov que es el adecuado por la cantidad de muestras.

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

Conclusión del test: Se rechaza la hipótesis nula, se acepta hipótesis alternativa.

Pruebas de normalidad

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-----------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| RIE (ng/mL) | ,323 | 60 | ,000 | ,444 | 60 | ,000 |
| MAGLUMI (ng/mL) | ,309 | 60 | ,000 | ,466 | 60 | ,000 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Tabla 5. Pruebas de normalidad.

Dado que en el test de Kolmogorov-Smirnov se obtuvo una significancia de 0,000 (ver tabla 5), este es menor a al nivel de significación de 0,05, por lo tanto, se descarta la hipótesis nula, aceptando la hipótesis alternativa, con esto se confirmó que los datos no se distribuían de forma normal.

Los gráficos Q-Q presentados a continuación también confirman que la distribución de los datos no es normal ya que los puntos representados no se alinean sobre la recta “Normal esperado vs Valor esperado” (Ver gráficos 6 y 7)

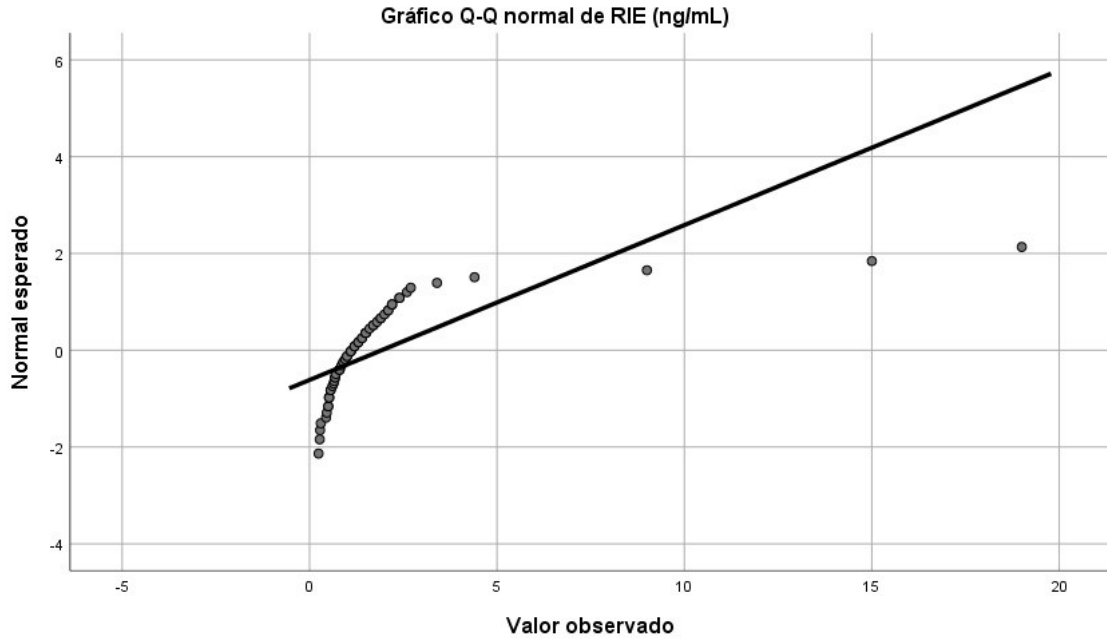


Gráfico 6. Gráfico Q-Q normal del método RIA

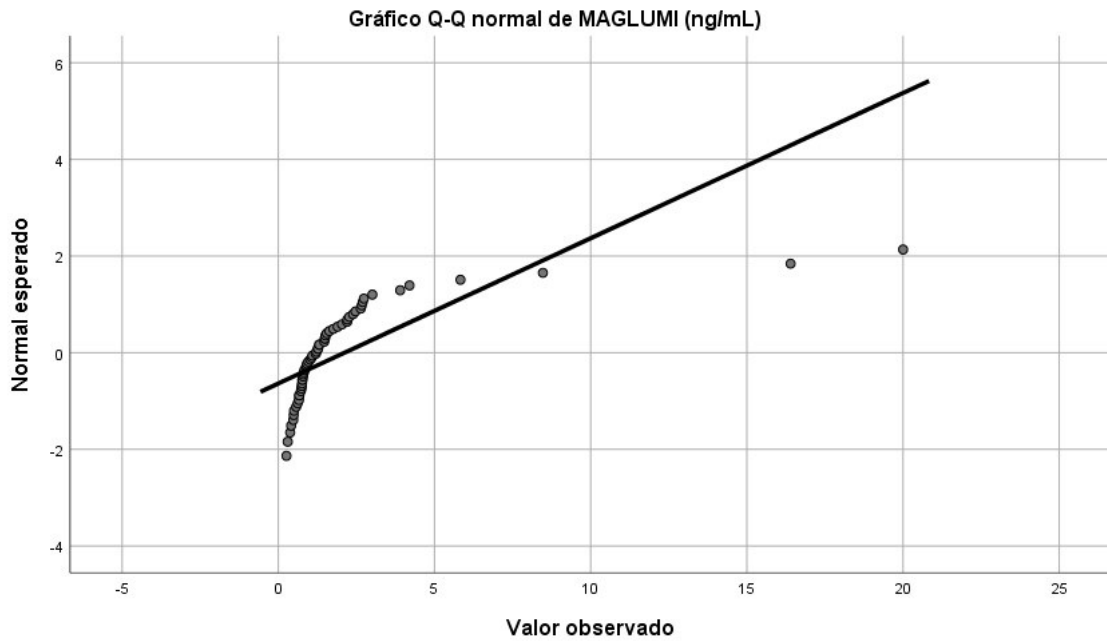


Gráfico 7. Gráfico Q-Q normal método quimioluminiscencia (MAGLUMI).

Correlación de los métodos

Debido a que los datos no se distribuían de manera normal se utilizó la prueba no paramétrica de correlación de Spearman para establecer si los métodos son independientes o están relacionados, también se determinó la fuerza de correlación.

Criterio para fuerza de correlación según coeficiente Rho:

| | | | |
|-------------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 0 – 0,25 Escasa o nula. | 0,26 – 0,50 débil. | 0,51 – 0,75 Entre moderada y fuerte. | 0,76 – 1,00 Entre fuerte y perfecta. |
|-------------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|

Ho: Las variables son independientes.

H1: Las variables están relacionadas.

Nivel de significación (α) = 0,05.

Conclusión del test: Se rechaza la hipótesis nula, se acepta la hipótesis alternativa.

Fuerza de correlación: Fuerte.

Correlaciones

| | | RIE (ng/mL) | | MAGLUMI (ng/mL) | |
|-----------------|-----------------|-----------------------------|--------|-----------------|--------|
| Rho de Spearman | RIE (ng/mL) | Coefficiente de correlación | 1,000 | | ,855** |
| | | Sig. (bilateral) | . | | ,000 |
| | | N | 60 | | 60 |
| | MAGLUMI (ng/mL) | Coefficiente de correlación | ,855** | | 1,000 |
| | | Sig. (bilateral) | ,000 | | . |
| | | N | 60 | | 60 |

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

Tabla 6. Correlación de Spearman.

El valor de la significancia calculado es menor al nivel de significación (Ver tabla 6), por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se determina que los dos métodos están relacionados, además por el coeficiente de correlación Rho obtenido (0,855) se puede predecir que la correlación es positiva con una fuerza de correlación clasificada como fuerte.

Análisis de las medianas

Posteriormente se evaluaron las medianas de ambos métodos para determinar si existen diferencias significativas mediante el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras relacionadas.

Resumen de contrastes de hipótesis

| | Hipótesis nula | Prueba | Sig. | Decisión |
|---|---|---|------|----------------------------|
| 1 | La mediana de diferencias entre RIE (ng/mL) y MAGLUMI (ng/mL) es igual a 0. | Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas | ,006 | Rechace la hipótesis nula. |

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,050.

Tabla 7. Test de Wilcoxon.

En el 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 determinó que existen diferencias significativas entre las medianas de ambos métodos (ver tabla 7).

Análisis de las diferencias

En el siguiente paso se analizaron las diferencias para detectar: Error sistemático y error aleatorio.

Para evaluar la concordancia entre métodos se analizó si existen diferencias sistemáticas mediante el gráfico de Bland-Altman donde:

-En el eje de las ordenadas se representó la diferencia entre los dos métodos para cada muestra (MAGLUMI-RIA).

-En el eje de las abscisas se graficó el promedio de cada pareja de resultados obtenidas para cada una de las muestras. Además, en rojo se graficó la media relativa de las diferencias y en verde los límites para el $IC \pm 1.96 SD$.

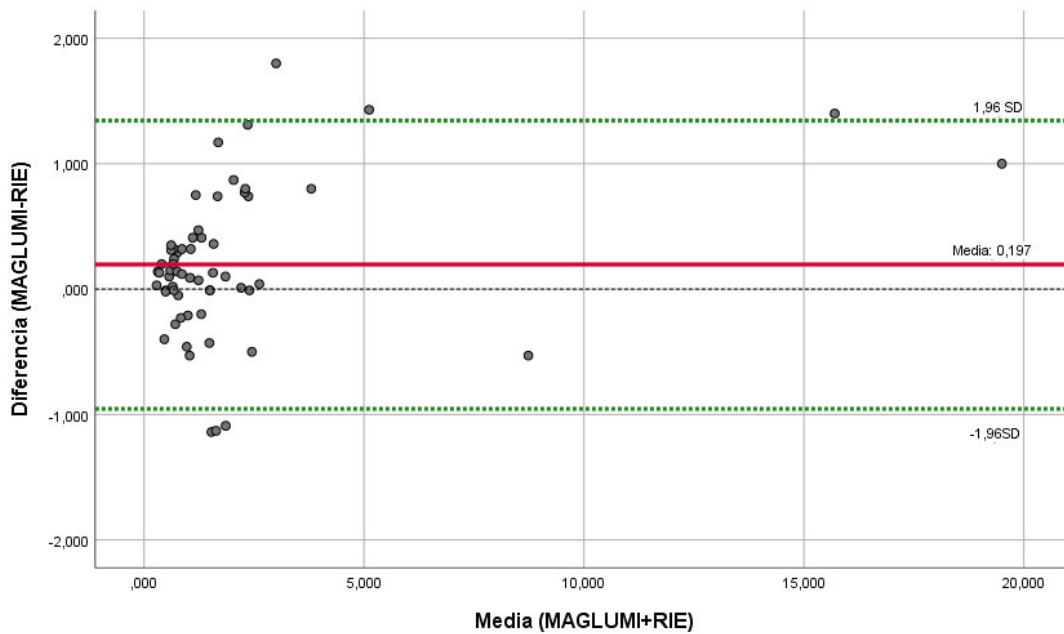


Grafico 8. Diagrama de Bland-Altman para diferencia absolutas.

La media de las diferencias arrojó un valor de 0,197. Para interpretar el resultado se verificó que el intervalo de confianza incluye al valor 0 (cero), esto con un criterio estadístico indicaría que no existen diferencias significativas para ambos métodos y los resultados de los métodos evaluados serían intercambiables, sin embargo, se observan varios puntos fuera de los límites establecidos y gran dispersión en los puntos, por este motivo a continuación se realiza un gráfico de Bland-Altman en con un criterio biológico.

En el eje de las ordenadas se representó la diferencia relativa %, en rojo la diferencia media relativa, en verde y azul los límites de error sistemático por variabilidad biológica y en naranja el IC 95% $\pm 1,96$ SD.

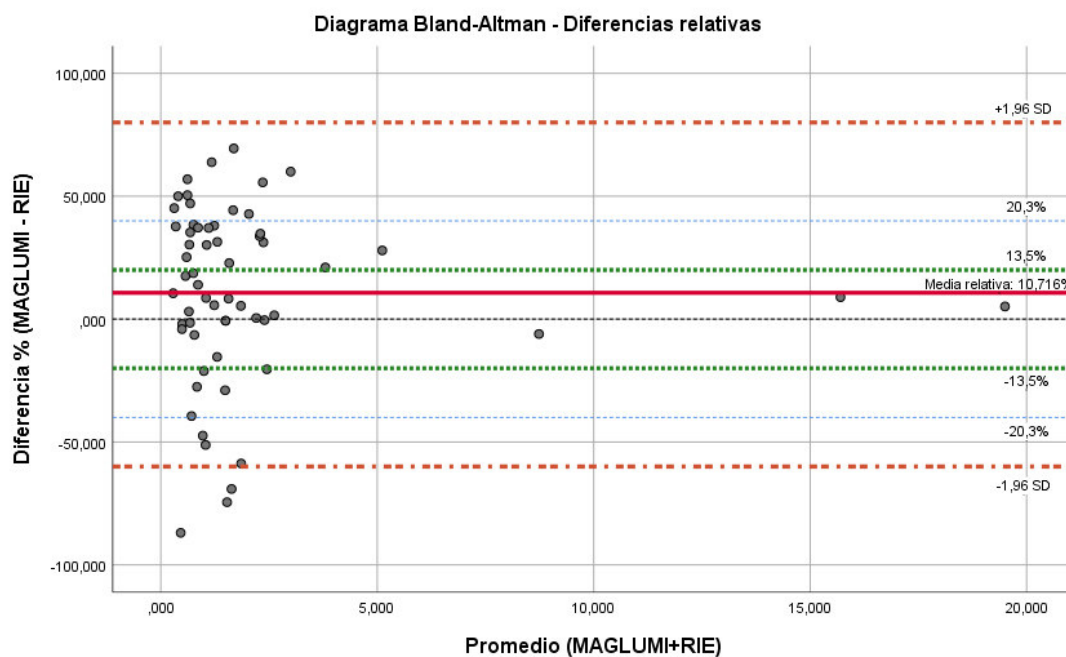


Grafico 9. Diagrama de Bland-Altman para diferencias relativas.

Para analizar las diferencias relativas con criterio biológico, en primer lugar se calculó la diferencia media relativa (DMR) entre ambos métodos y luego se definieron los límites para el error sistemático, calculando las desviaciones deseables y mínimas tolerables según Westgard:

DMR: 10,716%

Variabilidad biológica para 17OHP (Westgard 2021¹³): CV_I: 19,6; CV_G: 50,4.

Desviación deseable: $DMR < 0,25 (19,6^2 + 50,4_G^2)^{1/2}$: **13,519 %**

Desviación mínima: $DMR < 0,375 (19,6^2 + 50,4^2)^{1/2}$: **20,278 %**

Del análisis del gráfico surge que la DMR (**10,716%**) es menor a la desviación deseable según criterio de variabilidad biológica (**13,519%**), por lo tanto, los resultados por ambos métodos se consideran intercambiables. Por otra parte, se observan puntos fuera de los límites deseables o mínimos, considerando que la DMR cumple con los límites establecidos, se realiza análisis estadístico para dichos puntos, se aceptan $\pm 1,96$ SD con

IC 95% , el resultado cumple con lo esperado ya que solo 3 de 60 muestras se encuentran fuera del IC.

Para evaluar el error aleatorio o imprecisión (I%), también se utilizó el criterio de variabilidad biológica. Se realizó el cálculo del CV del método Maglumi ® utilizando los datos del control de calidad interno a dos niveles N1: 4,000 ng/mL y N2: 12,000 ng/mL.

| <i>I% de Maglumi ® según VB; I (%) = f x CV_i</i> | <i>Fórmula</i> | <i>Metas de I% para 17OHP (Westgard)</i> |
|---|----------------|--|
| Óptimo | f= 0,25 | 0,25 x CV _i |
| Deseable | f= 0,50 | 0,50 x CV _i |
| Mínimo | f= 0,75 | 0,75 x CV _i |
| I% Maglumi ® N1 | 9,96 | Conclusión: Cumple VB mínima |
| I% Maglumi ® N2 | 10,22 | Conclusión: Cumple VB mínima |

Tabla 8. Cálculo de imprecisión con CV_i 19,6 (según Westgard).

Según los datos observados en la tabla 8, el desempeño del equipo Maglumi ® cumple con el criterio de variabilidad biológica mínima para el analito 17OHP en los dos niveles evaluados.

A continuación se realizó cálculo del sesgo y error total con criterio de variabilidad biológica para el método Maglumi ® utilizando los datos del control de calidad interno a dos niveles N1: 4,000 ng/mL y N2: 12,000 ng/mL.

| <i>BIAS % y Error total de Maglumi ® según VB</i> | | | | | | |
|---|------|---------------|------------|---------------|-----------------------------|------------|
| Nivel de CCI | BIAS | BIAS deseable | Conclusión | Error Total % | Requisito de error total VB | Conclusión |
| Nivel 1 | 7,75 | 13,5 | Cumple | 24,19% | 29,70% | Cumple |
| Nivel 2 | 9,03 | 13,5 | Cumple | 25,88% | 29,70% | Cumple |

Tabla 9. Cálculo de Sesgo y BIAS (según VB Westgard).

Según los datos observados en la tabla 9, el sesgo y error total del equipo Maglumi® cumplen con los requerimientos de calidad con criterio de variabilidad biológica deseable para el analito 17OHP en los dos niveles evaluados.

Regresión lineal

Sabiendo que ambos métodos se encuentran relacionados, pero con diferencias significativas en las medianas; el análisis de error sistemático y aleatorio fue satisfactorio, considerando ambos métodos equivalentes. El siguiente paso fue realizar la regresión lineal de Passing & Bablok.

Regresión no paramétrica de Passing - Bablok

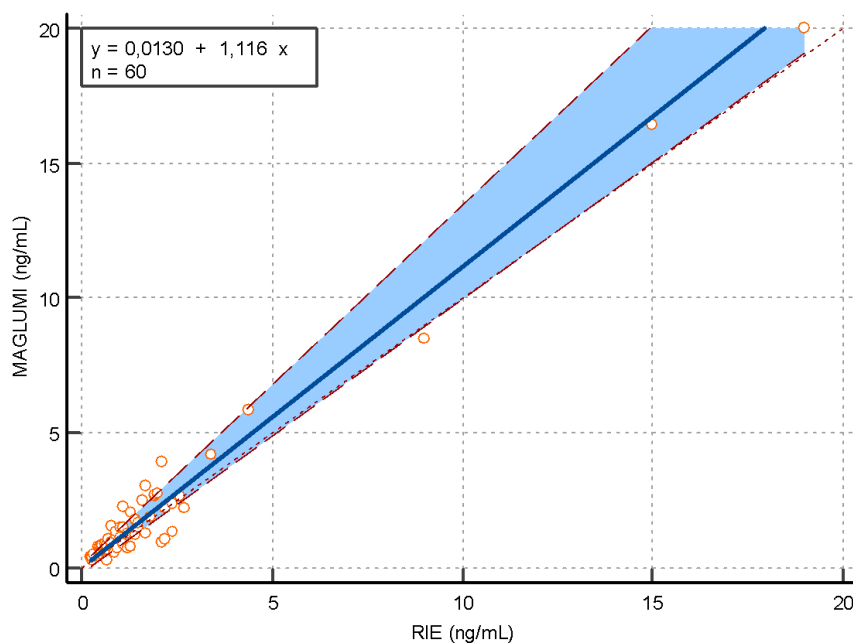


Grafico 10. Regresión de Passing-Bablok.

Ecuación de la recta

$$y = bx + a$$

$$y = 1,116 x + 0,0130$$

a (ordenada al origen) = IC 95% : -0,1607 a 0,1196

b (pendiente) = 1,0117 a 1,3318

Al interpretar los resultados se observa que mediante el análisis de regresión de Passing-Bablok se obtiene un IC 95% para la ordenada al origen que pasa por el valor 0 (cero), por lo tanto se considera que no existe un error sistemático en la ordenada, al evaluar la pendiente se observa que el IC 95% se desvía mínimamente del valor 1, en consecuencia el equipo Maglumi ® presenta un error sistemático proporcional y los resultados serán levemente superiores a los aportados por el método RIA.

8. Discusión

En el presente trabajo se realizó la comparación entre dos metodologías de análisis, RIA y quimioluminiscencia Maglumi ® 600, para el dosaje de 17OHP. El plan de análisis se centró en demostrar que independientemente del método utilizado, estos deben brindar resultados de máxima calidad, con la más alta precisión y exactitud para obtener un diagnóstico certero en el menor tiempo posible.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante análisis estadístico, estos son positivos en el sentido de poder afirmar que se consideran a ambos métodos equivalentes e intercambiables para diagnóstico clínico dado que se cumple con el criterio de análisis biológico para 17OHP. Esto se fundamenta al analizar la correlación que existe y la concordancia entre los métodos donde, según los gráficos de Bland-Altman la diferencia media % entre ambos (10,7%) es menor a la desviación máxima deseable según variabilidad biológica (13,5%) (Westgard, 2021¹³⁻).

En cuanto a la dispersión de los datos observados mediante los gráficos de Bland-Altman, el 95% de los valores se encuentran dentro del IC 95% \pm 1,96 SD, por lo tanto, son estadísticamente aceptables.

Además se determinó que el sesgo, la imprecisión y el error total para el método Maglumi® se encuentran dentro de los límites de tolerancia establecidos por variabilidad biológica.

El análisis de la regresión Passing - Bablok mostró que según la ecuación: $y = 1,116x + 0,0130$ no existe sesgo en la ordenada ya que esta incluye el valor 0 (cero) dentro del IC

95% (: -0,1607 a 0,1196), pero la pendiente mostró valores levemente superiores a 1 para el IC 95% (1,0117 a 1,3318), lo que indica que existe un mínimo sesgo proporcional, donde el equipo Maglumi® aporta resultados levemente superiores al método de referencia RIA, se considera que esto no invalida la utilidad clínica de Maglumi®.

9. Conclusión

De acuerdo al análisis estadístico realizado, los métodos RIA y quimioluminiscencia Maglumi ® 600 se consideran equivalentes e intercambiables para la determinación del metabolito 17OHP; los resultados muestran que ambos métodos son de utilidad en el diagnóstico clínico, ya que evidencian buena correlación y concordancia según criterio biológico, además todos los parámetros de calidad: CV, sesgo y error total evaluados para el nuevo método Maglumi ®, cumplen con los criterios de variabilidad biológica.

El sesgo proporcional observado en la regresión lineal muestra que Maglumi ®, aportaría resultados levemente superiores a RIA, por esto se recomienda que el seguimiento de los pacientes sea realizado siempre por el mismo método, pero no condiciona su utilidad clínica debido a los buenos resultados de correlación, concordancia y parámetros de calidad obtenidos.

Para finalizar, evidenciada la correlación y concordancia de los métodos estudiados, no se estima necesario modificar los intervalos de referencia.

10. Bibliografía

- 1- Castracane, V. D., & Gimpel, T. (1997). *Comparison of three methods for 17 α -Hydroxyprogesterone*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11(4), 179–185.
DOI: [10.1002/\(sici\)1098-2825\(1997\)11:4<179::aid-jcla1>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2825(1997)11:4<179::aid-jcla1>3.0.co;2-4)
- 2- Gardner, D. G., Shoback, D., Muñoz, B. R., & Sierra, G. E. P. (2012). *Greenspan Endocrinología básica y clínica*. McGraw-Hill Education.
- 3- *Inserto 17 – OH Progesterone (CLIA)*. (2019). Snibe.
- 4- *Inserto RIA 17 α – Hydroxyprogesterone*. (2019). Beckman Coulter.
- 5- Koeppen, B. M., Stanton B. A. (2009). *Berne Y Levy Fisiología C/Student Consult* (6^a ed.). Elsevier.
- 6- Kumar, V. (2014). *Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional* (8a ed.). Elsevier.
- 7- Latorre, S., Garzón, C., Manosalva, G., Merchán, S., Jacomussi, L., & Maldonado, S. (2016). *Hiperplasia adrenal congénita por déficit de 21 hidroxilasa: un reto diagnóstico y terapéutico*. *Revista repertorio de medicina y cirugía*, 25(2), 79–88.
- 8- M.I. New, M. Abraham, B. Gonzalez, M. Dumic, M. Razzaghy-Azar, D. Chitayat, et al. *Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (2013), pp. 2611-2616
- 9- Melmed, S., Koenig, R., Rosen, C., Auchus, R., & Goldfine, A. (2020). *Williams Textbook of Endocrinology (14th ed.)*. Elsevier.

- 10- Ms.gba.gov.ar. (7 de diciembre de 2021). *Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades congénitas (PRODyTEC)*.<https://www.ms.gba.gov.ar/sitios/prodytec/>[Recuperado el 7 de diciembre de 2021].
- 11- Ms.gba.gov.ar. (7 de diciembre de 2021). *Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Congénitas (PRODyTEC)*.<https://www.ms.gba.gov.ar/sitios/prodytec/1-1-antecedentes-generales/>
- 12- Organismo Argentino de Acreditación. (2019). *Guía para la validación de métodos de ensayo*.
- 13- Orío Hernández, M., Yebra Yebra, J., Bezanilla López, C. and Gracia Bouthelier, R., 2021. *Déficit de 11 β -hidroxilasa: mejoría de talla final con hormona de crecimiento y análogos de LHRH*. Asociación española de pediatría.
- 14- Ricos Et Al, Westgard C. (s. f.). Desirable Biological Variation Database specifications - Westgard. WestgardQC. Recuperado 25 de octubre 2021, de <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
- 15- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). *An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)*. *Biometrika*, 52(3/4), 591–611.
<https://doi.org/10.2307/2333709>
- 16- Testing.com. (30 de septiembre de 2021). *17-Hydroxyprogesterone*.
<https://labtestsonline.org/tests/17-hydroxyprogesterone>