

***Título del trabajo:** “DETERMINACIÓN DE 17α HIDROXIPROGESTERONA SÉRICA EN INFANTES POR RADIOINMUNOENSAYO”.

***Autores:** Pérez G; Ochetti M; Sobrero G; Nieva V; Huergo F; Silvano L; Martin S; Testa G; Muñoz L; Miras M.

***Lugar:** Hospital de Niños de la Santísima Trinidad. Córdoba.

***Dirección:** Ferroviarios esq. Bajada Pucará. CP 5000.

***Dirección Electrónica:** gnzperez@yahoo.com.ar, lilianafmunoz@yahoo.com.ar

***Teléfonos:** Gonzalo Pérez 0388 154961409; Liliana Muñoz 0351 152212515.

RESUMEN

La determinación de 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP) es utilizada para el diagnóstico y monitoreo de la Hiperplasia Adrenal Congénita (HAC). Problemas asociados con la especificidad de los anticuerpos utilizados en inmunoensayos directos pueden producir resultados falsamente elevados. **Objetivos:** Analizar niveles de 17OHP directa (17OHPd) y con extracción (17OHPe) en el período neonatal, establecer valores de referencia y relacionar niveles de 17OHPd y 17OHPe con otros andrógenos en pacientes con HAC. **Sujetos y métodos:** 400 neonatos e infantes sanos, 100 pacientes con HAC en tratamiento. 17OHP determinada por RIA-DPC. Extracción con isopropanol/heptano al 3%. **Resultados:** Se observó una correlación significativa de 17 OHP con la edad cronológica, pero no con la edad gestacional, sexo y peso. La diferencia entre 17OHPd y 17OHPe disminuyó con la edad. El índice de correlación entre 17OHPd y 17OHPe en pacientes con HAC fue 0,93 ($p < 0,01$). **Conclusión:** El método extractivo es necesario en el período neonatal hasta los 6 meses de vida.

Palabras clave: Hiperplasia Adrenal Congénita- 17- α hidroxiprogesterona- Neonatos- Valores de referencia.

INTRODUCCIÓN

17 α -hidroxiprogesterona (17OHP) es el marcador bioquímico más utilizado para el diagnóstico y monitoreo de la Hiperplasia Adrenal Congénita (HAC) debida a la deficiencia en la actividad de la enzima 21-hidroxilasa.

La HAC comprende un grupo de enfermedades hereditarias autosómicas recesivas, causadas por un defecto en alguna de las enzimas necesarias para la biosíntesis del cortisol. 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 (1,2).

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 (HAC-C) diagnosticadas por lo general en las primeras semanas de vida, y una forma de comienzo tardío descrita como forma no clásica (HAC-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. Estos valores varían según el grupo étnico estudiado (3).

La interpretación de los niveles de 17OHP en neonatos e infantes está influenciada por factores tales como edad gestacional (EG), edad cronológica (EC) a la toma de muestra, sexo, peso al nacimiento (PN), estrés, y presencia de interferentes esteroideos producidos por la corteza adrenal fetal (4-8). Estos metabolitos esteroideos circulantes, pueden sobreestimar los valores de 17OHP obtenidos por inmunoensayos directos, produciendo resultados falsamente elevados. Esto conduce a la necesidad de

realizar procedimientos extractivos previos para mejorar la especificidad del método y establecer valores de referencia adecuados (9-12).

En nuestro medio no se cuenta con valores de referencia de 17OHP sérica directa (17OHPd) y con extracción (17OHPe) para la determinación de 17OP en sangre de pacientes durante los primeros meses de vida.

OBJETIVOS

- Analizar la relación de los niveles séricos de 17OHPd y 17OHPe con EG, EC, sexo y PN en neonatos e infantes sanos.
- Establecer valores de referencia.
- Relacionar los niveles séricos de 17OHPd y 17OHPe con los niveles de otros andrógenos circulantes en pacientes pediátricos con HAC con terapia hormonal sustitutiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos:

Se investigaron 400 neonatos e infantes sanos sin medicación de 2 a 365 días (Femeninos: n= 195; Masculinos n= 205), EG \geq 37 semanas, PN \geq 2500g que concurrieron al Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba para realizarse la pesquisa neonatal.

Se analizaron 100 pacientes con HAC bajo terapia sustitutiva de 1 a 16 años de EC (Femeninos n= 57; Masculinos n= 43).

Las muestras de suero fueron almacenadas a - 30°C hasta su determinación.

Inmunoensayo:

La concentración de 17OHP se determinó en suero en forma directa y con un proceso de extracción previo. Las concentraciones de 17OHP séricas se midieron por radioinmunoensayo de tubo recubierto (DPC, Coat-A-Count 17 α -OH Progesterona).

Se analizó la reproducibilidad determinando la precisión interensayo del radioinmunoensayo en forma directa y con el proceso extractivo previo. Se confeccionaron para ello dos controles con niveles diferentes de 17OHP, con droga pura y suero libre de esteroides. Se realizó la recuperación del proceso extractivo con los controles mencionados.

Método extractivo

El procedimiento extractivo se realizó con 100 μ l de suero y 1 ml de isopropanol/heptano al 3% en un tubo de vidrio (9, 10). Se agitó vigorosamente en un vórtex durante 2 minutos, se centrifugó a 1400 x g durante 10 minutos. De cada vial se transfirió una alícuota de 0,5 ml de la fase isopropanol/heptano a otro tubo de vidrio. El extracto se secó bajo corriente de nitrógeno gaseoso, y el residuo se reconstituyó con 50 μ l de suero libre de esteroides.

La concentración de androstenediona (A4) se determinó con RIA DPC. Testosterona y sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA) se midieron por Electroquimioluminiscencia (EQLIA) Elecsys 2010 Roche.

Análisis estadístico: análisis de varianza y de regresión lineal.

RESULTADOS

Variables analíticas

En la tabla N°1 se muestran los valores medios, desvíos estándares y coeficientes de variación porcentual para los controles procesados en forma directa y con extracción previa.

Tabla 1. Precisión interensayo para 17OHP directa y extraída.

| Muestra N=20 | Media ± DE (ng/ml) | CV% |
|---------------------|-----------------------|-------|
| 17OHPd Control 1 | 4,51 ± 0,35 | 7,76 |
| 17OHPd Control 2 | 2,16 ± 0,24 | 11,11 |
| 17OHPe Control 1 | 4,26 ± 0,50 | 11,73 |
| 17OHPe Control 2 | 2,01 ± 0,34 | 16,92 |

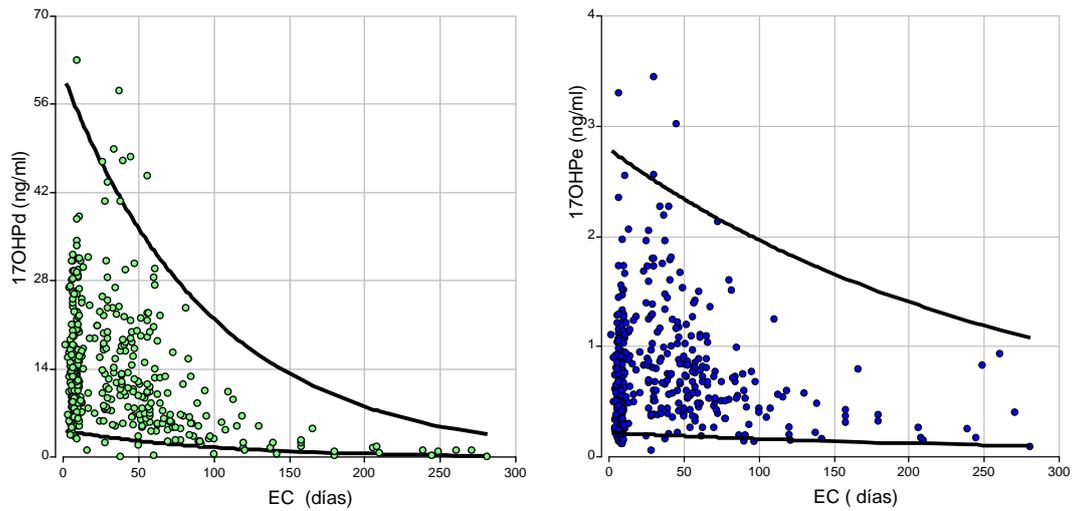
La media de la recuperación del proceso extractivo fue del 94%, con un rango de recuperación del 90 al 98 % para los dos controles utilizados (n=40). La eficiencia de la extracción fue similar a la reportada previamente por otros trabajos científicos (11-13).

Variables biológicas

El análisis de los niveles de 17OHPd y 17OHPe en neonatos sanos no mostró correlación significativa con la EG, peso y sexo.

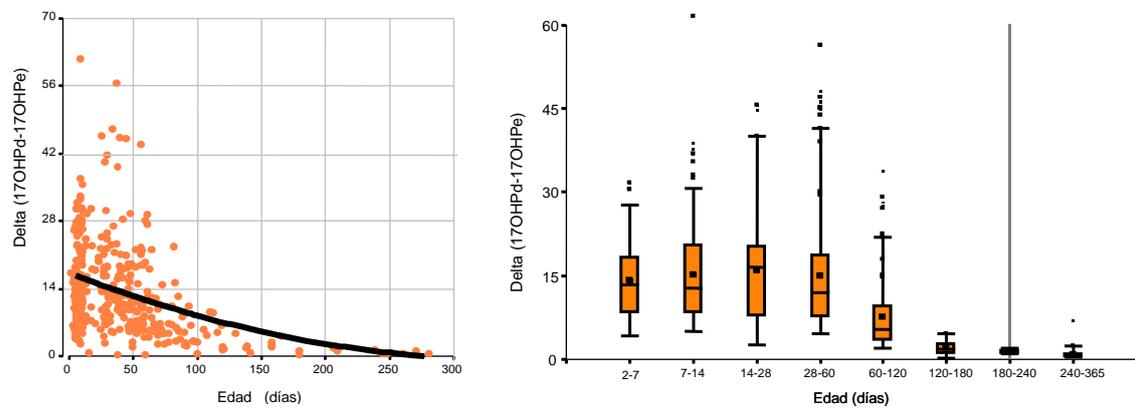
Se observó una correlación significativa de 17OHPd y 17OHPe con EC al momento de la toma de muestra ($p < 0.001$) (Figura 1).

Fig. 1. Relación entre 17OHPd y 17OHPe (ng/ml) con EC (días).



La diferencia entre 17OHPd y 17OHPe disminuyó con la edad haciéndose mínima y constante a partir de los 6 meses de EC. (Figura2).

Fig. 2. Relación entre la diferencia de 17OHPd - 17OHPe (ng/ml) con EC (días).



Valores de referencia

Para establecer los valores de referencia de 17OHPd y 17OHPe se calcularon los percentilos de la distribución de frecuencias P5% y P95% (Tabla N°2).

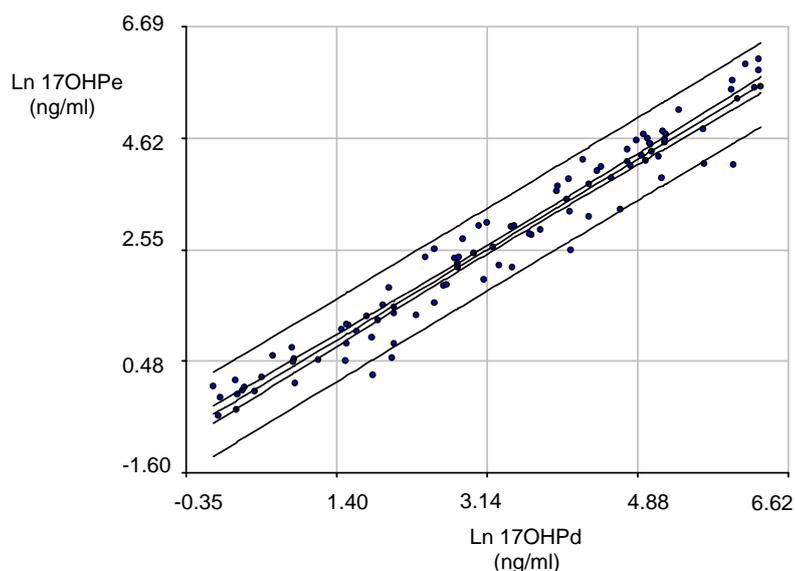
Tabla 2. Valores de referencia de 17OHPd y 17OHPe.

| EC | 17OHPd (ng/ml) | | 17OHPe (ng/ml) | |
|-----------|----------------|-------|----------------|-------|
| | P 5% | P 95% | P 5% | P 95% |
| 2 – 7 | 4,00 | 56,80 | 0,18 | 2,64 |
| 7 – 14 | 3,90 | 54,60 | 0,18 | 2,61 |
| 14 – 28 | 3,30 | 47,50 | 0,17 | 2,46 |
| 28 – 60 | 2,70 | 38,50 | 0,16 | 2,29 |
| 60 – 120 | 1,90 | 26,30 | 0,14 | 2,01 |
| 120 -180 | 0,50 | 7,30 | 0,09 | 1,32 |
| 180 – 240 | 0,50 | 6,90 | 0,07 | 1,03 |
| 240 – 365 | 0,20 | 3,50 | 0,07 | 1,03 |

Pacientes con HAC en terapia sustitutiva

Los valores de 17OHPd de los pacientes con HAC variaron ampliamente según el cumplimiento de la terapia sustitutiva (rango: 0,3 a 536 ng/ml). Se observó una correlación significativa entre 17OHPd y 17OHPe $r=0,93$ $p < 0,001$, (Figura 3).

Fig. 3. Correlación entre 17OHPd y 17OHPe en pacientes con HAC.



No se observó correlación significativa entre 17OHPd y la diferencia (17OHPd – 17 OHPe) con los niveles $\Delta 4$ (rango: 0,04- 44,4 ng/ml), SDHEA (rango: 0,1- 213,1 $\mu\text{g/dl}$) y To (rango: 12-776 ng/ml) en pacientes con HAC.

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Los valores de 17OHP determinados mostraron cambios relacionados con la edad, lo que hace necesario la definición de percentilos adecuados. Los resultados obtenidos en este estudio proveen valores de referencia en infantes desde el nacimiento hasta el año de vida. Nuestros datos podrían ser útiles para realizar el diagnóstico temprano de HAC y el seguimiento de los neonatos con niveles elevados de 17OHP sin patología adrenal.

Escasos estudios han reportado valores de referencia de 17OHP en recién nacidos e infantes. En la mayoría de ellos, la muestra analizada fue pequeña particularmente en los primeros meses de vida (14- 23).

Las muestras de bebés menores a dos días de edad no fueron analizadas debido a que durante el último trimestre de embarazo la circulación materna contiene altos niveles de 17OHP y ésta atraviesa la placenta siendo eliminada dentro de las primeras 48 horas de vida en neonatos a término sanos (24- 28).

En el período neonatal hay un riesgo de reacción cruzada en la determinación de 17OHP por RIA con esteroides 3β -hidroxi-5 α producidos en la zona fetal de la glándula adrenal. La concentración de estos esteroides en el suero puede variar más que la de 17OHP, particularmente en recién nacidos pretérminos y enfermos (29). Debido a que en la zona fetal los esteroides están presentes en gran medida en forma de conjugados, ellos pueden ser retenidos en la fase acuosa si los esteroides libres (como 17OHP) son extraídos previamente en un solvente orgánico (30, 31).

Para la determinación rutinaria de 17OHP se usan casi exclusivamente inmunoensayos con distintos tipos de marcación: radioisotópicos, enzimáticos y fluoreométricos a tiempo resuelto. Sin embargo los inmunoensayos directos sobreestiman los niveles de 17OHP debido a una especificidad insuficiente del anticuerpo, especialmente en neonatos, debido a la reactividad cruzada de metabolitos esteroideos de origen adrenal fetal (32). Muchos de estos metabolitos esteroideos sulfatados fueron identificados: 17OH- Pregnenolona, 16OH- Pregnenolona, pregnenolona y varios pregnenetrioles. La 17OH- Pregnenolona sulfato sería uno de los esteroides que interferiría más significativamente en los inmunoensayos (9).

La producción de esteroides interferentes disminuye con el aumento de la EG y de EC del recién nacido hacia la infancia temprana (33).

Algunos intentos han sido realizados para mejorar la especificidad de la determinación de esteroides adrenales usando extracción y cromatografía de alta resolución (HPLC) previos al RIA (34). El empleo de espectrometría de masa asociada a cromatografía gaseosa o líquida permitió alcanzar una mayor especificidad en la determinación de 17OHP (35, 36). Sin embargo, el problema de los resultados falsos positivos en prematuros o recién nacidos estresados, que tienen una reducida actividad de la 11-hidroxilasa, no puede ser superado completamente con la determinación única de 17OHP (7).

En nuestro estudio se observó una correlación significativa ($r=0,93$; $p < 0,001$) entre los resultados de 17OHPd y 17OHPE en pacientes con HAC tratados con terapia sustitutiva. Esta correlación se mantuvo a pesar de las distintas concentraciones de andrógenos observadas durante el tratamiento, por lo tanto en estos pacientes no sería necesario realizar el proceso extractivo.

Los niveles elevados de 17OHP determinados en nuestras muestras de suero sin extraer en el período neonatal ponen en evidencia que el anticuerpo anti-17OHP utilizado en el radioinmunoensayo de DPC sobreestima los valores del analito presentes en estas muestras. Esta observación fue corroborada por otros trabajos (6- 11, 34).

Nuestros datos avalan la conveniencia de emplear procedimientos extractivos en la determinación de 17OHP en el período neonatal y en los primeros seis meses de vida para evitar las interferencias observadas durante esta etapa, no siendo necesaria su implementación a edades mayores para el diagnóstico y monitoreo de pacientes con HAC.

Tanto para la 17OHPd como para 17OHPe se observó una disminución de sus valores en función de la EC, probablemente reflejando la maduración de la corteza adrenal con la concomitante involución de la zona adrenal fetal.

La obtención de valores de referencia para la metodología extractiva asegura su utilidad en el diagnóstico y control evolutivo de pacientes con HAC en los primeros seis meses de vida.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21:245-91.
- 2- Huynh T, McGown I, Cowley D, Nyunt O, Leong GM, Harris M, Cotterill AM. The clinical and biochemical spectrum of congenital adrenal hyperplasia secondary to 21-hydroxylase deficiency. *Clin Biochem Rev* 2009; 30 (2): 245- 258.
- 3- Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2003; 349:766-88.

- 4- Linder N, Davidovich N, Kogan A, Barzilai A, Kuint J, Mazkeret R, Sack J. Longitudinal measurements of 17 hydroxyprogesterone in premature infants during the three months of life. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999; 81:F175-F178.
- 5- Gruneiro-Papendieck L, Prieto L, Chiesa A, Bengolea S, Bossi G, Bergada C. Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia: adjustments to the recall protocol. *Horm Res* 2001; 55:271–277.
- 6- Van der Kamp Hetty J, Wit Jan M. Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia. *European Journal of Endocrinology* 2004; 151: U71-U75.
- 7- Riepe F G, Sipell WG. Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Rev Endocr Metab Disord* 2007; 8:349-363.
- 8- Torresani T, Biason-Lauber A. Congenital adrenal hyperplasia: Diagnostic advances. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:563-575.
- 9- Wong T, Cedric HL, Shackleton, Thomas R, Grahams E. Identification of the steroids in neonatal plasma that interfere with 17 hydroxyprogesterone radioimmunoassays. *Clin Chem* 1992; 38:1830-1836.
- 10- Sinkka K, Makela A, Graham E. Nonspecificity of a direct 17- α -Hydroxyprogesterone Radioimmunoassay kit when used with samples from neonates. *Clin Chem* 1988; 34: 2070- 2075.
- 11- Lee A, Ellis G. Serum 17 hydroxyprogesterone in infants and children as measure by a direct Radioimmunoassay Kit. *Clin Biochemistry* 1999; 24:505-511.
- 12- Haruo M, Yoichiro O, Yukari S, Tetsuya I, Tomonobu H, Keito H, Hajime U, Makoto O and Hajime T. Transient hyper-17-OHPnemia unrelated to cross-reactions with residual fetal adrenal cortex products. *Horm Res* 2004; 61:242-245.

- 13- Castracane D, Gimpel T. Comparison of three methods for 17α Hydroxyprogesterone. *J Clin Lab Analysis* 1997; 11:179-185.
- 14- Cortes A, Ferrandez A, Mayayo E, Labarta JI, Maerinez R. Valores de referencia hormonales de función corticosuprarrenal en niños sanos zaragozanos. *An Esp Pediatr* 2000; 52: 106- 115.
- 15- Doerr Hg, Sippell WG, Versmold HT, Bidlingmaier F, Knorr D. Plasma mineralocorticoids, glucocorticoids, and progestins in premature infants: longitudinal study during the first week of life. *Pediatr Res* 1988; 23: 525- 529.
- 16- Fadalti M, Petraglia F, Luisi S, Bernardi F, Casarosa E, Ferrari E, Luisi M, Saggese G, Genazzani AR, Bernasconi S. Changes of serum allopregnanolone levels in the first 2 years of life and during pubertal development. *Pediatr Res* 1999; 46: 323- 327.
- 17- Forest MG, Sizonenko PC, Cathiard AM, Bertrand J. Hypophyso-gonadal function in humans during the first year of life. *J Clin Invest* 1974; 53: 819- 828.
- 18- Lashansky G, Saenger P, Fishman K, Gautier T, Mayes D, Berg G, Di Martino-Nardi J, Reiter E. Normative data for adrenal steroidogenesis in a healthy pediatric population: Age- and sex-related changes after adrenocorticotropin stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 674- 686.
- 19- Peretti E, Forest MG. Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulphate levels in humans from birth to adulthood: evidence for testicular production. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47: 572- 577.
- 20- Tomlinson C, Macintyre H, Dorrian CA, Ahmed SF, Wallace AM. Testosterone measurements in early infancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89: F 558- 559.

- 21- Wiener D, Smith J, Dahlem S, Berg G, Moshang T. Serum adrenal steroid levels in healthy full-term 3-day-old infants. *J Pediatr* 1987; 110: 122-124.
- 22- Winter JSD, Hughes IA, Reyes FI, Faiman C. Pituitary-gonadal relations in infancy: 2. Patterns of serum gonadal steroid concentrations in man from birth to two years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42: 679- 686.
- 23- Garagorri J, Rodriguez G, Lario- Elboj A, Olivares J, Lario-Muñoz A, Orden I. Reference levels for 17-hydroxyprogesterone, 11-desoxycortisol, cortisol, testosterone, dehydroepiandrosterone sulphate and androstenedione in infants from birth to six months of age. *Eur J Pediatr* 2008; 167: 647- 653.
- 24- Florence E, Harrison R, Johnson M, Youssefnejadian E. Plasma 20 α -dihydroprogesterone, progesterone and 17-hydroxyprogesterone in normal human pregnancy. *Acta Endocrinol* 1977; 86: 634- 640.
- 25- Sippell WG, Dorr HG, Bidlingmaier F, Knorr D. Plasma levels of aldosterone, corticosterone, 11-desoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, cortisol and cortisone during infancy and childhood. *Pediatr Res* 1980; 14: 39- 46.
- 26- Godo B, Visser HKA, Degenhart HJ. Plasma 17-OH-progesterone in full term and preterm infants at birth and during the early neonatal period. *Horm Res* 1981; 15: 65- 74.
- 27- Doerr Hg, Sippell WG, Versmold HT, Bidlingmaier F, Knorr D. Plasma mineralocorticoids, glucocorticoids and progestins in premature infants: longitudinal study during the first weeks of life. *Pediatr Res* 1988; 23: 525- 529.
- 28- Hughes IA, Riad- Fahmy D, Griffiths K. Plasma 17-OH-progesterone concentrations in newborn infants. *Arch Dis Child* 1979; 54: 347- 349.
- 29- Kristi W. Fetal Adrenal Development: Implications for lung development and postnatal disease. *NeoReviews* 2006; 7: 135- 142.

- 30- Honour J, Rumsby G. Problems in diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 45: 69- 74.
- 31- Meier U, Schnabel C, Kunz D, Driesch R, Gressner A. Comparison of three commercial assays for the measurement of 17 α Hydroxyprogesterone limitations of the quality control system. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42 (4): 450- 454.
- 32- Asby D, Arlt W, Hanley N. The adrenal cortex and sexual differentiation during early human development. *Rev Endocr Metab Disord* 2009; 10: 43- 49.
- 33- Kamp H, Oudshoorn C, Otten B, Verkerk P. Cutoff levels of 17-Hydroxyprogesterone in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia should be based on gestational age rather than on birth weight. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3904- 3907.
- 34- Turpein U, Itkopnen O, Ahola L and Stenman H. Determination of 17 α hydroxyprogesterone in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and immunoassay. *Scand J Clin Lab Invest* 2005; 65:3-12.
- 35- Wudy SA, Wachter UA, Homoki J, Teller WM. 17 alpha-hydroxyprogesterone, 4 androstenedione, and testosterone profiled by routine stable isotope dilution/gas chromatography-mass spectrometry in plasma of children. *Pediatr Res* 1995; 38: 76- 80.
- 36- Wudy SA, Hartmann M, Svoboda M. Determination of 17-Hydroxyprogesterone in plasma by stable isotope dilution/benchtop liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *Horm Res* 2000; 53: 68- 71.