TRABAJOS ORIGINALES

EVALUACION DE SENSIBILIDAD-ESPECIFICIDAD DE VALORES DE 17OH PROGESTERONA SERICA, BASALES Y POST ESTIMULO CON ACTH, EN FUNCION DEL ANALISIS MOLECULAR DEL GEN CYP21A2 EN LA DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA NO CLASICA.

Dres. E. Chaler, R. Marino, V. Goris, P. Ramírez, M. Maceiras, N. Dujovne, N. Geniuk, J. M. Lazzati, M. Mendioroz, M. A. Rivarola*, A. Belgorosky**

RESUMEN

La forma no clásica, post natal, de la hiperplasia suprarrenal congénita tiene una incidencia de 1 en 1000 en la población general y afecta al 6% de las mujeres hirsutas. En este estudio se estableció la sensibilidad y la especificidad de la respuesta de los niveles séricos de 17-hidroxiprogesterona (17OHP4) al estímulo agudo con ACTH en 203 pacientes de ambos sexos, pre y post puberales, con hiperandrogenismo, en los cuales se analizó si tenían una alteración molecular del gen CYP21A2. Posteriormente al estudio molecular, los pacientes fueron clasificados en tres grupos de acuerdo al genotipo: Gr0, n=61: ningún alelo mutado (no portadores de mutación); Gr1, n=55: un alelo mutado (portadores) y Gr2, n=87: dos alelos mutados (afectados). Por análisis de regresión logística (curvas ROC) se compararon los valores basales del Gr2 vs Gr0 y se obtuvo un valor de 17OHP4 de 7,2 ng/ml con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 85%. Se sugiere entonces que en los pacientes con este nivel basal no se debería realizar el test de ACTH, y habría que confirmar el diagnóstico con el estudio molecular. Los niveles 17OHP4 a los 60 minutos post estímulo con ACTH mayores a 20 ng/ml son confirmatorios del diagnóstico con 84% de sensibilidad y 88% de especificidad. No sería necesario entonces realizar estudios moleculares. Un valor de 15,6 ng/ml diferencia Gr2 de Gr0 con una sensibilidad del 89% y una especificidad del 95%. Este es un buen valor predictivo, pero el análisis molecular no debería obviarse en aquellos casos en los que exista una fuerte sospecha clínica.

Palabras clave: Deficiencia de 21-hidroxilasa, hiperplasia suprarrenal congénita, genotipo, 17-hidroxiprogesterona.

Medicina Infantil 2010; XVII: 109 - 114.

ABSTRACT

The incidence of non classic congenital adrenal hyperplasia is 1:1000 in the general population and it is present in 6% of hirsute women. In this study, the sensitivity and specificity of serum 17-hydroxyprogesterone (17OHP4) response to acute ACTH stimulation was evaluated in 203 prepubertal and pubertal patients of the two sexes with hyperandrogenism, in whom the CYP21A2 gene was analyzed. After molecular analysis patients were divided in 3 groups according to genotype: Gr0, n=61, no mutated allele (no mutation carrier); Gr1, n=55, one mutated allele (carrier); and Gr2, n=81, two mutated alleles (affected patient). Using logistic regression analysis (ROC curves), basal values in Gr2 vs. Gr0 were compared and a cutoff value of 7.2 ng/ml was defined to separate groups, with 83% sensitivity and 85% specificity. It is suggested then that in patients with levels higher than 7,2 no ACTH test is necessary and molecular analysis is required to confirm diagnosis. Serum 17OHP4 values above 20 ng/ml 60 minutes after ACTH are confirmatory of diagnosis, with 84% sensitivity and 88% specificity. No molecular studies should be necessary. A 15.6 ng/ml cutoff value is able to differentiate Gr2 from Gr0, with 89% sensitivity and 95% specificity. It is a good predictive value, but carrying out molecular analysis is only advisable if clinical evidence is strong.

Key words: *Hydroxylase deficiency, congenital adrenal hyperplasia, genotype, 17-hydroxyprogesterone.*

Medicina Infantil *2010; XVII: 109 - 114.*

Servicio de Endocrinología. Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan.
* Investigador Superior CONICET, ** Investigadora Principal CONICET.
Jefa del Servicio de Endocrinología.
Correspondencia: Dr. Eduardo A. Chaler - echaler@yahoo.com
Combate de Los Pozos 1881-CP 1245 - CABA.

INTRODUCCION

El 90% de los casos de hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) se debe a la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa (21OHD), una enfermedad de

herencia autosómica recesiva[1], que es uno de los desórdenes endócrinos innatos más comunes.

Las anormalidades moleculares del gen CYP21A2 que codifica para la 21-hidroxilasa llevan a varios grados de deficiencia de cortisol y aldosterona, y exceso de andrógenos.

En función del nivel de actividad enzimática de 21OHD se describe una forma clásica de expresión clínica temprana y una forma no clásica de expresión tardía. La forma clásica presenta dos variantes, 1) La HSC perdedora de sal y 2) la HSC virilizante simple, en la que no se evidencian clínicamente alteraciones electrolíticas, ambas reveladas al nacimiento. La forma no clásica con aparición de comienzo tardío (late-onset) es de diagnóstico en la niñez, o más comúnmente, a partir de la pubertad[2].

La forma no clásica (NC) tiene una incidencia de 1 en 1000 en la población caucásica, y en un 6% de las mujeres hirsutas[3]; sin embargo la frecuencia varía en función del grupo étnico[4,5].

Debido a la menor actividad 21OHD se produce un aumento de la secreción de adenocorticotrofina (ACTH) para lograr una adecuada síntesis de cortisol. Este estímulo lleva a una hiperplasia de la corteza adrenal y acumulación de los metabolitos de la esteroidogénesis previos al bloqueo enzimático; como consecuencia se produce un aumento de los andrógenos adrenales que generan signos de virilización precoz en niños de ambos sexos, asociados a un avance de la maduración esquelética, cuando se expresa durante el período prepuberal.

Durante la edad puberal se observa frecuentemente hirsutismo en la mujer asociado a trastornos del ciclo menstrual. Un desafío clínico habitual de la adolescente con hirsutismo es descartar como causa a la HSC, ya que el manejo suele ser diferente del de otras causas de hirsutismo. Por otra parte, en el varón la HSC NC puede ser confundida con la virilización habitual que ocurre durante el desarrollo puberal. Sin embargo la disociación entre el menor volumen testicular, por inhibición gonadotrófica de los andrógenos suprarrenales en exceso, y el grado de hiperandrogenismo clínico deben alertar al diagnóstico.

La determinación de los niveles séricos basales de la 17α-hidroxiprogesterona (17OHP4), metabolito previo al bloqueo, resulta ser una herramienta de utilidad diagnóstica en la forma clásica. Sin embargo en la forma no clásica los niveles séricos basales pueden ser similares a los niveles séricos basales de sujetos no afectados. El test de estímulo con ACTH ha sido reconocido, en varias series de pacientes con hiperandrogenismo[6,7], como una prueba útil para permitir orientar el diagnóstico. Sin embargo el límite de corte diagnóstico para la HSC NC es aún controvertido.

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio fue establecer la sensibilidad y la especificidad de la respuesta de los niveles séricos de 17OHP4 al estímulo agudo con ACTH en pacientes de ambos sexos con hiperandrogenismo.

MATERIALES Y METODOS

Se analizaron las 11 mutaciones más frecuentes del gen CYP21A2 (Del/Conv; P30L; In2; Ex3; I172N; CIEx6; V281L; Q318X; R356W; P453S; R483fs).

En todos los pacientes fue analizado el gen CYP21 para las 11 mutaciones más comunes usando ADN extraido de linfocitos de sangre periférica por procedimientos estándar. Los estudios moleculares fueron realizados de acuerdo a una estrategia de cascada previamente descripta[8,9,10]. Brevemente, las 10 mutaciones puntuales más comunes fueron analizadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) alelo específica (P30L, In2, Ex3, I172N, CIEx6, V281L, R356W, P453S, R483fs) o polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) con la enzima de restricción PstI (Q318X). Se detectaron deleciones génicas y grandes conversiones por análisis de ADN digerido con Taq I y BglII; e hibridizado con un probe radiomarcado para CYP21.

La concentración de 17OHP4 en suero fue medida por radioinmunoensayo (Diagnostic System Laboratories SA, LA).

MATERIAL CLINICO

Se incluyeron pacientes con signos clínicos de hiperandrogenismo que presentaban: los prepúberes, pubarca precoz, y/o axilarca, y/o olor axilar, y/o pubertad precoz; los púberes, hirsutismo, y/o trastornos del ciclo, y/o acné, y/o virilización. Los pacientes fueron derivados de múltiples establecimientos de salud del país a nuestro servicio para estudio molecular del gen CYP21A2.

Se realizó la prueba de estímulo con ACTH (25 UI por vía intramuscular), según está descripto en la literatura (The Corning Endocrine manual, A guide to selection and interpretation of endocrine tests, Corning Nichols Institute, 1996), y se evaluó la 17OHP4 sérica, basal y 60 minutos post estimulo, en todos los pacientes.

Posteriormente al estudio molecular, los pacientes fueron clasificados en tres grupos de acuerdo al genotipo: Gr0: ningún alelo mutado (no portadores de mutación); Gr1: un alelo mutado (portadores) y Gr2: dos alelos mutados (afectados), distribuidos como se detalla en la Tabla 1.

ANALISIS ESTADISTICO

La comparación de medias se realizó usando el test de Kruskal-Wallis. La sensibilidad y espe-

TABLA 1: NUMERO DE PACIENTES Y EDAD.

	Estadio puberal	n	Mujeres (n)	Varones (n)	Edad cronológica (rango-años)
Gr0 (n:61)	Pp	36	35	1	0-12
	P	25	24	1	14-34
Gr1 (n:55)	Pp	27	26	1	0-15
	P	28	27	1	8-32
Gr2 (n:87)	Pp	40	34	6	3-14
	P	47	47	0	8-36
Total		**203**	**196**	**9**	

Gr0: ningún alelo mutado; **Gr1:** un alelo mutado y **Gr2:** dos alelos mutados. **Pp:** prepuberal; **P:** puberal.

cificidad de los niveles séricos de 17OHP4, basal y 60 minutos post estímulo con ACTH, se analizó mediante regresión logística (curva ROC).

RESULTADOS

Análisis de 17OHP4 sérica

Los niveles séricos de 17OHP4 basales entre el Gr0 y Gr1 no presentaron diferencia significativa, 3.69±3.04 y 4.83±5.04 ng/ml, respectivamente, mientras que en el Gr2, el valor, 22.77±24.30 ng/ml, fue significativamente más alto que en los otros dos, p<0.001. (Figura 1 A).

A los 60 minutos post estímulo con ACTH, los niveles séricos de 17OHP4 fueron: Gr2 38.56±26.28, significativamente mayor (p<0.001) que el Gr1 y el Gr0, 13.95±6.89 y 9.54±4.20 ng/ml, respectivamente, y el Gr1 mayor que el Gr0, p<0.01. (Figura 1 B).

Análisis de regresión logística (curvas ROC) para valores de 17OHP4 sérica

Se compararon los valores basales del Gr2 vs Gr0 y del Gr2 vs Gr1. Para diferenciar Gr2 de Gr0 se obtuvo un valor de de 17OHP4 de 5,5 ng/ml para discriminar a los no afectados con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 86%. Para diferenciar Gr2 de Gr1 se obtuvo un valor de 17OHP4 de 7,2 ng/ml para indicar que el paciente está afectado con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 85% (Figura 2).

Se compararon los resultados obtenidos en muestras de 60 minutos post estímulo con ACTH del Gr2 vs Gr1, Gr2 vs Gr0 y Gr1 vs Gr2. Un valor de 17OHP4 sérica superior a 20,0 ng/ml diferencia portadores (Gr1) de afectados (Gr2), y es confirmatorio de HSC con una sensibilidad del 84% y una especificidad del 88%. Un valor entre 15,6 y 20 ng/ml diferencia Gr2 de Gr0 con sensibilidad del 89% y especificidad del 95%, orienta a considerar que los pacientes pueden estar afectados o ser portadores e indica que no debe obviarse un estudio molecular. Finalmente un valor menor de 11,18 ng/ml diferencia Gr1 de Gr0, y puede considerarse no afectado con una sensibilidad y una especificidad bajas (61% y 70% respectivamente) (Figura 3).

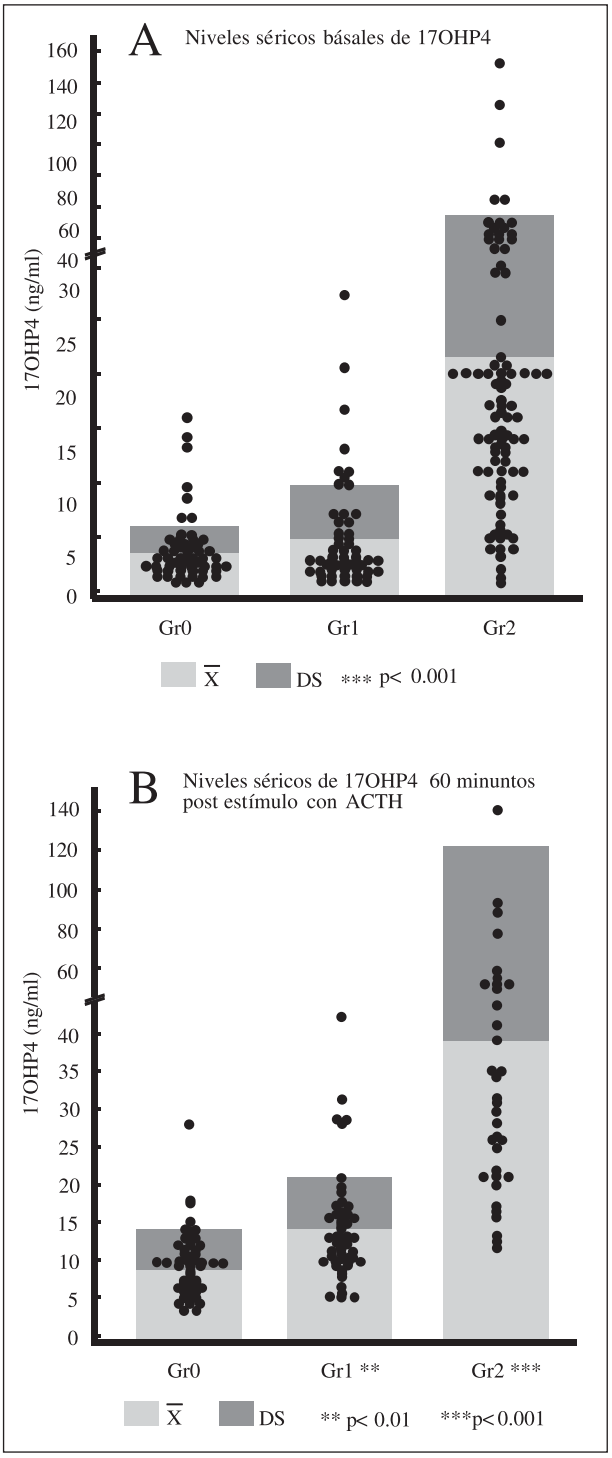

Figura 1: A. Los niveles séricos basales de 17OHP4 de los grupos Gr0 y Gr1 no presentan diferencia significativa entre sí, pero ambos son diferentes del Gr2. **B.** Los niveles séricos post estímulo con ACTH del Gr1 son significativamente más altos que los del grupo Gr0 y a la vez el Gr2 es mayor que los Gr0 y Gr1.

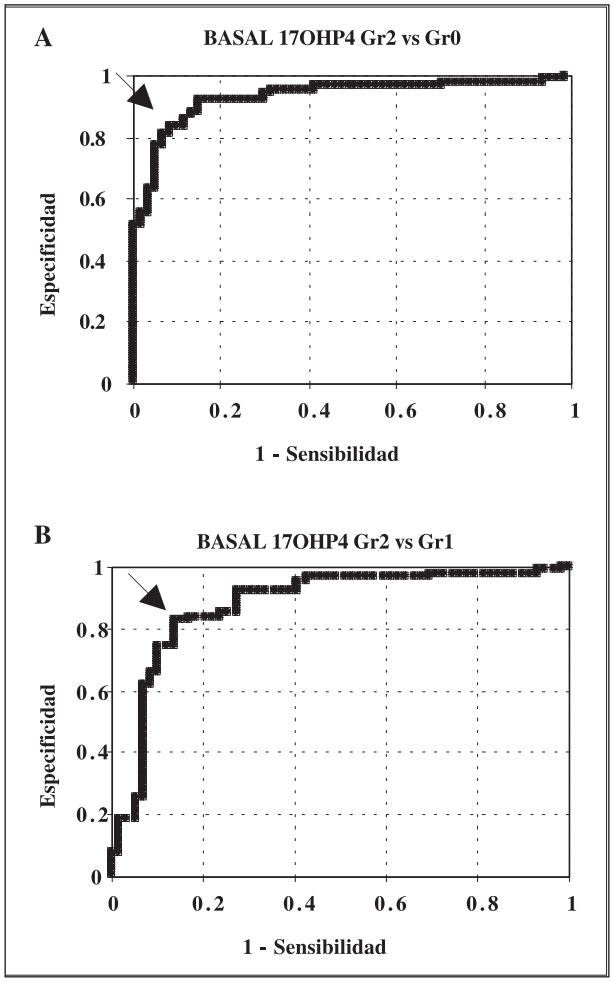

Figura 2: A. Comparando el Gr2 vs Gr0, se observa que por debajo de 5.5 ng/ml se discrimina el Gr0 (pacientes no afectados) con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 86%. **B.** Un valor basal de 7,2 ng/ml o mayor de 17OHP4 sérica indica que el paciente está afectado con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 85%.

DISCUSION

Los niveles séricos de 17OHP4 evaluados después de un estímulo agudo con ACTH, son ampliamente utilizados para realizar el diagnóstico de la HSC-NC; el punto de corte diagnóstico corrientemente utilizado es de 10,0 ng/ml; que corresponde al valor más alto encontrado en heterocigotas obligados para 21OH en el nomograma establecido antes de los estudios moleculares, por New y col.[11]. Sin embargo en varios trabajos se ha encontrado portadores que responden por sobre ese límite de corte diagnóstico, con valores de 15,0, 20,0, y hasta de 30,0 ng/ml[12,13,14].

La forma NC tiene una alta frecuencia de alelos no identificados comparados con la forma clásica en varias poblaciones estudiadas, sugiriendo la existencia de un diagnóstico incorrecto de esta forma[15,16,17].

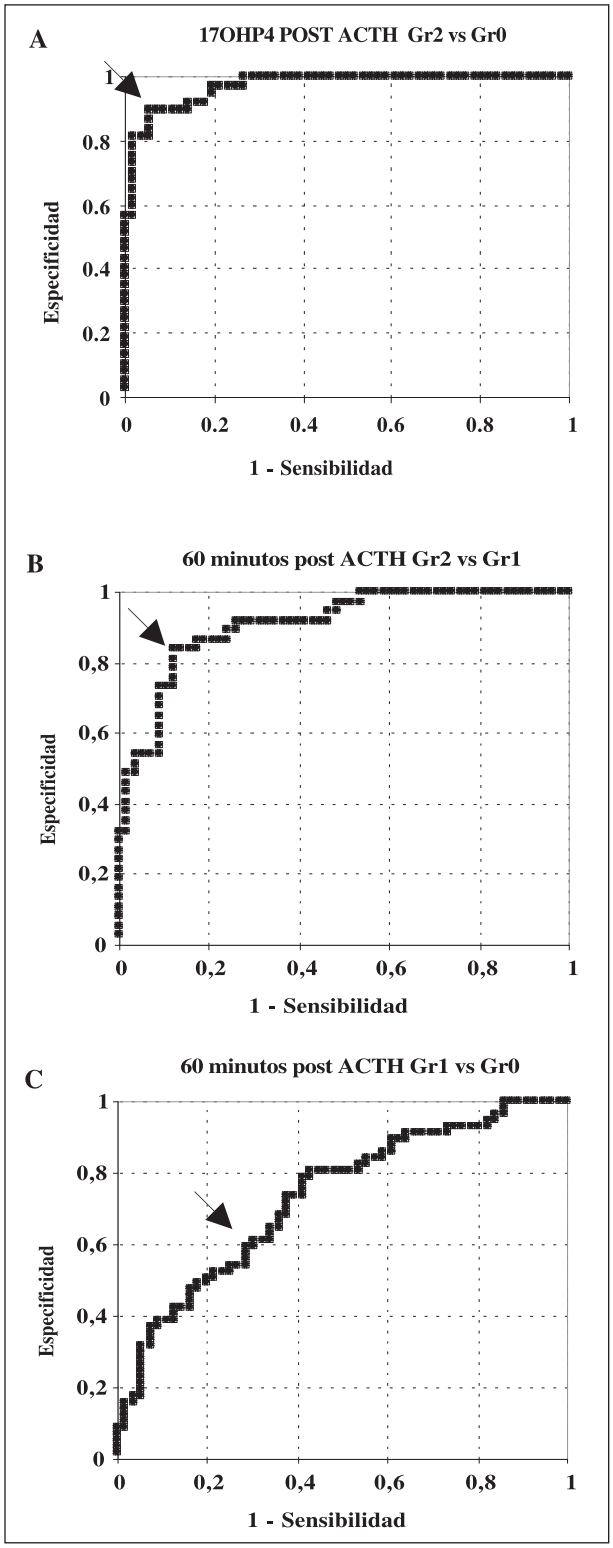

Figura 3: A. Un valor de 17OHP4 sérica superior a 20 ng/ml es confirmatorio de HSC NC, con una sensibilidad del 84% y una especificidad del 88%. B. Un valor de 17OHP4 sérica entre 15,6 y 20 ng/ml orienta a considerar que los pacientes pueden estar afectados o ser portadores y en este caso no debería obviarse un estudio molecular. C. Con una sensibilidad del 61% y una especificidad del 70%, con un valor de 17OHP4 sérica menor de 11,18 ng/ml puede considerarse al paciente como no afectado.

Toda esta información lleva a que el valor de respuesta de 17OHP4 post estímulo con ACTH continúa siendo un punto de debate y una herramienta diagnóstica que debe ser reanalizada.

Nosotros hemos sometido los datos obtenidos a un análisis de regresión logística y evaluamos cuáles son los límites de corte diagnóstico utilizando este instrumento estadístico, buscando el mejor equilibrio entre sensibilidad y especificidad de los valores séricos de 17OHP4 basales y post estímulo con ACTH en pacientes con hirsutismo clínico. Esto tiene como objetivo identificar portadores o afectados con mutaciones del gen CYP21A2; de cualquier forma, otros puntos de corte que se han propuesto pueden ser utilizados, pero generarán selecciones con criterios más específicos y menos sensibles, o viceversa.

Las mutaciones heterocigotas han sido encontradas en una alta frecuencia en la población general. Se han realizado muchos esfuerzos para detectar esta población herterocigota usando análisis de esteroides plasmáticos. La 17OHP4 post ACTH es uno de los más comunes, pero se ha encontrado una considerable superposición entre heterocigotas y población control, lo que dificulta la predicción de portadores de la enfermedad. Esto fue confirmado por nuestros datos, ya que no encontramos diferencia significativa entre el Gr0 y Gr1 en los resultados basales, y si bien hubo una diferencia significativa en los niveles de 17OHP4 séricas post ACTH, la superposición de resultados es tan amplia que, el mejor de un punto de diferenciación entre estos grupos (11,2ng/ml) tiene baja sensibilidad y especificidad (70.% y 61%) para diferenciarlos. Sólo el estudio molecular puede identificar Gr0 de Gr1, por lo que se considera que es el estudio recomendable para poder realizar el asesoramiento genético.

Los niveles séricos básales de 17OHP4 mayores a 7,2 ng/ml se observan en pacientes con dos alelos afectados, con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 85%. Se sugiere entonces que en los pacientes con este nivel basal no se debe realizar el test de ACTH y se debe confirmar el diagnóstico con el estudio molecular.

Los niveles séricos de 17OHP4 a los 60 minutos post estímulo con ACTH mayores a 20 ng/ml son confirmatorios de diagnóstico de déficit de 21-hidroxilasa forma NC, con 84% de sensibilidad y 88% de especificidad. No sería necesario entonces realizar estudios moleculares para su confirmación.

El valor de 15,6 ng/ml 17OHP4 sérica post ACTH, permite, con una sensibilidad 89% y una especificidad 95%, diferenciar Gr0 de Gr2, y es un buen valor predictivo para la deficiencia de 21Hidroxilasa forma NC, pero dado que puede existir un grupo no detectado, el análisis molecular no debería obviarse en aquellos casos en los que haya una fuerte sospecha clínica.

Estos puntos de corte diagnóstico que hemos encontrado son coincidentes con los de publicaciones recientes[18].

CONCLUSION

Se concluye que el análisis molecular es la herramienta más útil para confirmar el diagnóstico, caracterizar el genotipo y realizar asesoramiento genético en pacientes con signos clínicos de sospecha de HSC NC.

REFERENCIAS

1. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hiperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Endocr Rev. 2000. 21:245-291.
2. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesse M, New MI, White PC. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hiperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J. Cli. Invest. 1992. 90:584-595.
3. Kuttenn F, Couillin P, Girard F, Billaud L, Vincens M, Boucekkine C, Thalabard JC, Maudelonde T, Spritzer P, Mowszowicz I, Boue A, Mauvais-Jarvis P. Late-onset adrenal hyperplasia in hirsutism. N Engl J Med. 1985; 313:224-231.
4. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. Am J Hum Genet. 1985; 37:650-667.
5. Wilson RC, Nimkarn S, Duric M, Obeid J, Rzzaghy Azar M, Najmabadi H, Saffari F, New MI. Ethnic specific distribution of mutation in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. Mol Genet Metab. 2007; 90:414-421.
6. Sólyom J, Gács G, Keszei K, Láng K, Orlev J, Petheo I, Ságodi L. Detection of late-onset adrenal hyperplasia in girls with peripubertal virilization. Acta Endocrinol (Copenh) 1987; 115:413-418.
7. Baskin HJ. Screening for late-onset congenital adrenal hyperplasia in hirsutism or amenorrhea. Arch Intern Med. 1987; 147:847-848.
8. Anna Wedell and Holger Luthman. Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. Human Molecular genetics 1993; 2: 499-504.
9. Dardis A, Bergada I, Bergada C, Rivarola M, Belgorosky A. Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in an Argentinian population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia. J Pediatr Endocrinol Metab. 1997; 10: 55-61.
10. Dardis A, Marino R, Bergadá I, Escobar ME, Gryngarten M, Rivarola MA, Belgorosky A. Molecular analysis of the most frequent mutations associated with congenital adrenal hyperplasia secondary to 21-hydroxylase enzyme deficiency. Medicina (Buenos Aires). 2001; 6:28-34.
11. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, Dupont B, Stoner E, Levy DJ, Pang S, Levine LS. Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. J Clin Endocrinol Metab. 1983; 57:320-326.
12. Azziz R, Dewailly D, Owerbach D. Clinical review 56: Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. J Clin Endocrinol Metab. 1994; 78:810-815.
13. Moran C, Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Fruzzetti F, Ibañez L, Knochenhauer ES, Marcondes JA, Mendonca BB, Pignatelli D, Pugeat M, Rohmer V, Speiser PW, Witchel SF. 21-Hydroxylase deficient non classic adrenal hyperplasia is a progressive disorder : a multicenter study. Am J Obstet Gynecol. 2000; 183:1468-1474
14. Bachega TA, Brenlha EM, Billerbeck AE, Marcandes JA, Madureira G, Arnhold IJ, Mendonca BB. Variable ACTH-stimulated 17-hydroxiprogesterone values in 21-hydroxilase deficiency carriers are not related to the different CYP21 Gene mutations. J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87:786-790.

15. Ezequieta B, Oliver A, Gracia R, Gancedo PG. Analisys of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. Hun Genet. 1995; 96:198-204.
16. Carrera P, Bordone L, Azzani T, Brunelli V, Garancini MP, Chiumello G, Ferrari M. Point mutations in Italian patients with classic, non-classic, and cryptic formas of steroids 21-hydroxylase deficiency. Hum Genet. 1996; 98:662-665.
17. Rumsby G, Avey CJ, Conway GS, Honour JW. Genotype-phenotype analysis in late onset 21-hydroxylase deficiency in comparison to the classical forms. Clin Endocrinol. 1998; 48:707-711.
18. Bidet M, Bellanné-Chantelot C, Galand-Portier MB, Tardy V, Billaud L, Laborde K, Coussieu C, Morel Y, Vaury C, Golmard JL, Claustre A, Mornet E, Chakhtoura Z, Mowszowicz I, Bachelot A, Touraine P, Kuttenn F. Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with Nonclassical Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members. J Clin Endocrin Metab. 2009; 94:1570-1578.