



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Tesinas de Grado

Patiño, Luz Macarena

Validación de inmunoensayo quimioluminiscente de hormona Anti-Mülleriana

2023

Instituto de Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
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:

Patiño, L. M. (2023). *Validación de inmunoensayo quimioluminiscente de hormona Anti-Mülleriana* [Trabajo Final de Grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. <https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/2956>

Trabajo final

“Validación de inmunoensayo quimioluminiscente de hormona Anti-Mülleriana”

Universidad: Universidad Nacional Arturo Jauretche.

Instituto: Ciencias de la Salud.

Carrera: Bioquímica.

Estudiante: Patiño, Luz Macarena.

Directora: Tournier, Andrea.

E-mail: luzmacarena1995@gmail.com

Legajo: 12120.

Fecha de entrega: 30/11/2023

INDICE

- » Agradecimientos.
- » Abreviaturas.
- » Resumen.
- » Introducción e importancia del tema.
- 1. Hormona Anti-Mülleriana.
- 2. AMH en la vida intrauterina.
- 3. Síntesis de AMH.
- 4. Producción de AMH.
- 5. Relevancia clínica.
 - a) Anomalías genómicas en cromosomas sexuales.
 - b) Otras anomalías de relevancia clínica.
- 6. Especificaciones del método empleado.
- 7. Intervalos de referencia.
- 8. Revalidación del método.
 - » Objetivo.
 - ✓ Generales.
 - ✓ Específicos.
 - » Materiales y métodos.
 - ✓ Inmunoensayo quimioluminiscente.
 - ✓ Para realizar este trabajo.
 - » Resultados.
 - » Discusión.
 - » Conclusión.
 - » Referencias bibliográficas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero primeramente agradecer a Dios, sobre todo por ayudarme hasta este momento, en siguiente instancia doy gracias a mi familia, mamá, papá que con mucho esfuerzo me ayudaron en la distancia siempre dispuestos a animarme, para no bajar los brazos, hermanos, Leila, Federico y Debora, por siempre tener la palabra justa para animarme a seguir, a mis tíos y primas, que por muchos años estuvieron apoyándome en gran manera. No quiero dejar de lado a esas amigas que siempre están para apoyarme y alentarme. Sin dejar de lado doy gracias a mis abuelos Carmen, Nestor, Liberata y aun que ya no este con nosotros a mi abuelo Patiño. Además agradezco a mis actuales colegas y compañeras de trabajo, destacando a las doctoras Martelli , Rosa y Heredia, Lourdes. Agradezco a cada profesor que estuvo en mi camino durante cada materia, dando una mención especial entre ellos, claramente a Tournier, Andrea, por su paciencia en este largo camino; Rebolledo, Alejandro, que me hizo ver de manera diferente aun la especialidad en la que me enfoque..

ABREVIATIURAS

AMH: Hormona Anti-Mülleriana.
TGF-BETA: Factores de crecimiento transformante beta.
DHT: Dihidrotestosterona.
TGF- β : Transformante- β 1,2.
RIA: Radioinmunoensayo.
ELISA: Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas.
CLIA: Inmunoensayo quimioluminiscente.
IR: Intervalos de referencia.
FSH: Hormona foliculoestimulante.
FSH-R: Receptor de FSH.
AC: Adenilato ciclasa.
PKA: Proteína quinasa A.
AMPc: Adenosinmonofosfato cíclico.
SRY: Factor determinante testicular.
SOX9: Factor de transcripción de la familia SRY.
ACTH: Hormona adrenocorticotropa.
MES: Ácido-2-etanosulfónico.
GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina.

RESUMEN

La hormona Anti-Mülleriana recibe su nombre por su primera función descrita en la diferenciación sexual fetal, se une a receptores de membrana específico presente en células mesenquimales perimüllerianas, induciendo una regresión de los conductos de Müller en los niños de sexo masculino, durante la vida fetal temprana.² La función que cumple esta hormona es la que le otorga relevancia clínica en neonatos, ya que sus niveles van a ser diferentes según el sexo cromosómico del infante, siendo de suma importancia para ver la concordancia entre el sexo cromosómico, sexo gonadal y sexo fenotípico, en la diferenciación y formación del feto. Además de promover en el neonato lo ya mencionado, estimula el descenso de los testículos al escroto. Debido a su relevancia clínica, el objetivo del trabajo es verificar el IR propuesto por el fabricante **BECKMAN COULTER ACCESS Immunoassay Systems**, utilizando como población de estudio, las muestras de 20 lactantes masculinos y 20 femeninos de 0 - 60 días de vida, que concurren al Laboratorio de Endocrinología del Hospital de Niños “SSM Ludovica” de La Plata, considerando las pautas de exclusión. Teniendo en cuenta los criterios de revalidación para intervalos de referencia, a partir de los resultados obtenidos, se concluyó que es posible transferir el intervalo de referencia para la medición de hormona Anti-Mülleriana a la población pediátrica de 0-60 días que asiste al Hospital, tanto para individuos del sexo masculino como para individuos del sexo femenino.

INTRODUCCIÓN E IMPORTANCIA DEL TEMA

1. Hormona Anti-Mülleriana

La hormona Anti-Mülleriana es una glicoproteína extracélular que circula como un dímero compuesto por dos monómeros idénticos de 72 kDa. que están unidos por puentes disulfuro.³ Esta hormona pertenece a la superfamilia de TGF-BETA (encargadas de regular la proliferación y diferenciación celular), es expresada principalmente por las células de Sertoli inmaduras, estimulando la diferenciación, del sexo gonadal de los fetos.

2. AMH en la vida intrauterina

En seres humanos el sexo cromosómico, da lugar al sexo gonadal y este, al sexo fenotípico. Si bien un embrión posee un sexo cromosómico que queda dado en el momento de la fecundación, la diferenciación sexual depende de testosterona, DHT, AMH y de factores de la familia de la insulina, por lo que si el embrión es masculino, las células primordiales tienen un complemento de cromosomas sexuales XY. Por influencia del gen SRY localizado en el cromosoma Y, que codifica el factor determinante testicular, los cordones sexuales primitivos siguen proliferando y se introducen profundamente en la médula gonadal para formar los cordones testiculares o medulares.¹

Hacia el hilio de la glándula, los cordones se disgregan en una red de filamentos celulares diminutos, que ulteriormente darán origen a los tubulos de la red de Haller o rete testis. Durante el desarrollo ulterior la túnica albugínea, una capa compacta de tejido conectivo fibroso, separa los cordones del testículo, de la superficie epitelial.

En el cuarto mes los cordones testiculares toman una forma de herradura y sus extremos se continúan con los de la rete testis. Los cordones testiculares están compuestos en este momento por células germinales primordiales y células sustentaculares de Sertoli derivadas del epitelio superficial de la glándula.¹

Desde un punto de vista fisiológico la diferenciación sexual masculina en la vida fetal inicia antes de que el eje hipotálamo-hipofiso-testicular sea funcional, por lo que la secreción de la AMH se da por las células de Sertoli, siendo independiente de la producción de gonadotropinas, esta comienza en la séptima semana de gestación, después de la diferenciación de los túbulos seminíferos se han diferenciado, luego la AMH provoca la regresión de los conductos de Müller, permitiendo el desarrollo de los conductos de Wolff, que darán origen al epidídimo, los conductos deferentes y las vesículas seminales, además de la virilización de los genitales externo.⁷

Las concentraciones de AMH son altas hasta la pubertad, luego disminuyen lentamente a niveles residuales post-pubertad. Esta disminución de la producción de AMH durante la pubertad está relacionada con la etapa de desarrollo puberal.⁵

La mayor disparidad entre la diferenciación femenina y masculina se da por la concentración de AMH en mujeres que es hasta 50 veces menor que en los varones al momento del nacimiento.

En el desarrollo temprano del feto femenino, la falta de AMH, testosterona y DHT, es el programa de diferenciación femenina. La ausencia de AMH permite que los conductos de Müller se desarrollen aún más y se diferencia en útero, trompas de falopio y el tercio superior de la vagina, sin necesidad de estrógenos. El conducto de Wolff experimenta regresión, lo que resulta en la anatomía femenina interna. Aunque se ha descrito algunos factores que podría estar directamente implicado en la diferenciación femenina, la ignorancia respecto a los mecanismos implicados en este proceso nos obligan a considerar la diferenciación femenina como un programa por defecto, en el cual determinadas estructuras sensibles a la testosterona o a la DHT experimentan regresión al verse privada de estos factores. Por otra parte la falta de AMH evita la apoptosis del conducto de Müller que forman parte del sexo gonadal femenino.²

3. Síntesis de AMH

Para este trabajo se tomó en cuenta a niños hasta los 60 días de vida, ya que en los primeros meses postnatal, de los varones, en el que se dice que el infante está en periodo mini-puberal, la AMH es producida por el estímulo de la FSH a nivel testicular, que estimula la proliferación de células de Sertoli y regula positivamente su transcripción. Para esto la FSH se une a FSH-R, activando una vía de transducción clásica, donde interviene una enzima tipo GTPasa (proteína G_{α}), AC, que a su vez estimula a la PKA por medio del AMPc, este activa al promotor de la AMH, SOX9 que inicia la producción de la hormona, no obstante también se activan otros factores diferentes en la transcripción, que van a aumentar la producción de la hormona a nivel testicular.

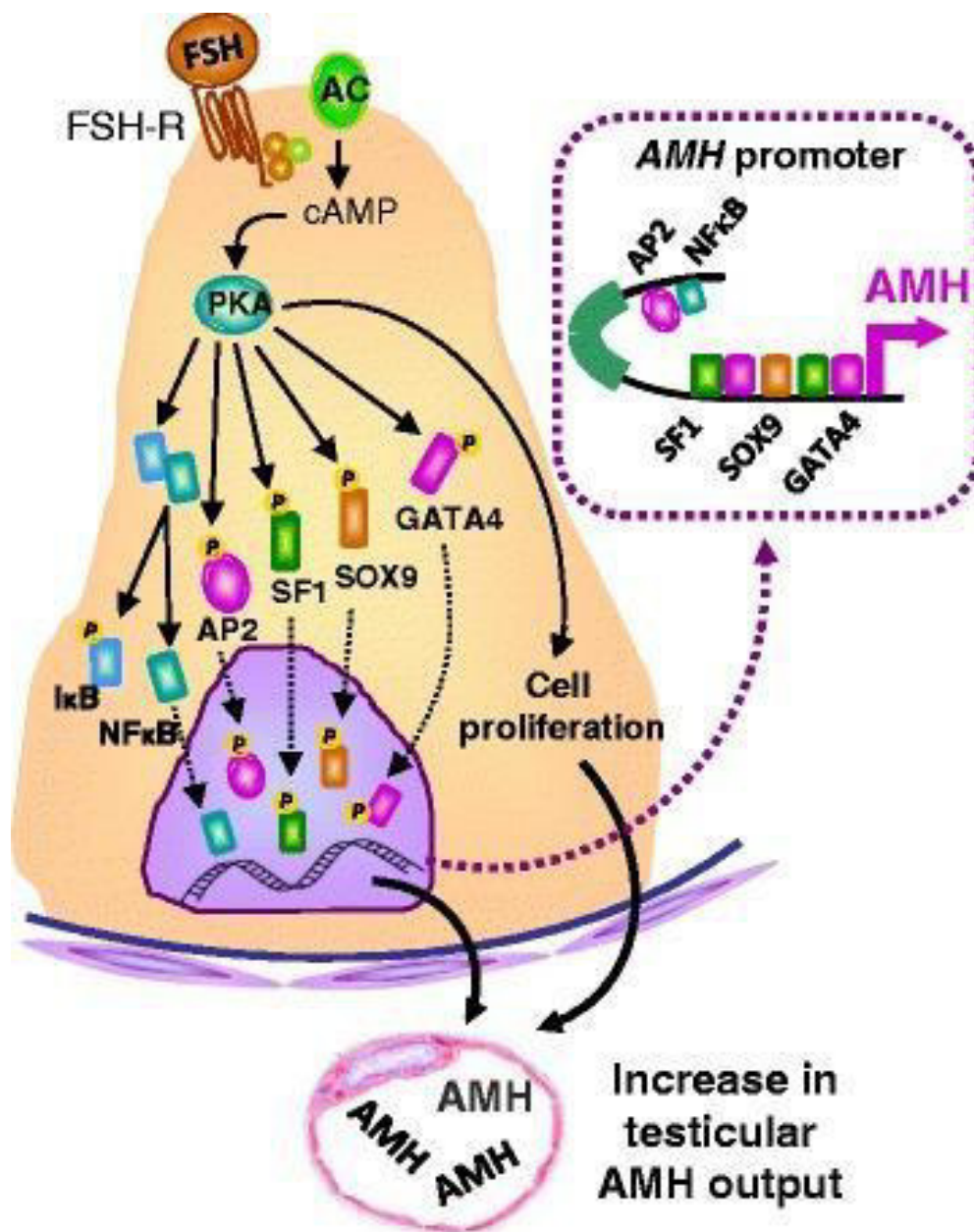


Imagen1: Cascada de señalización, para la síntesis de AMH.⁸

4. Producción de AMH

La AMH en hombres se produce en los testículos, mientras que en las mujeres se produce en los ovarios. Los niveles de esta hormona varían según el sexo y la edad, por esto es que medir sus niveles entrega información sobre una variedad de afecciones de salud reproductiva. En los bebés por nacer esta hormona entrega información sobre la formación de los órganos reproductores tanto masculinos como femeninos sabiendo que los bebés varones tienen cromosomas XY y las niñas tienen cromosomas XX, ahí tenemos la información genética para la producción y concentración de esta hormona, ya que varía según el sexo.

Los bebés varones producen altos niveles de AMH en su tejido testicular, estos niveles se mantienen altos en los niños hasta la pubertad cuando comienza a disminuir.

Las bebés mujeres que no han nacido aún tienen niveles muy bajos de AMH, por lo que los conductos Mülllerianos se convertirán en el útero, las trompas de falopio y la parte superior de la vagina, esta se mantiene baja en niñas y en la edad puberal, los folículos dentro de los ovarios (pequeños sacos en los ovarios que contienen óvulos inmaduros), comienzan a producir más hormona. Mujeres sanas en edad fértil tienen niveles altos de AMH significa que los ovarios tienen un mayor suministro de óvulos, a medida que las mujeres envejecen la cantidad de óvulos disminuye, lo que hace que los niveles de AMH bajen en la menopausia, no obstante no quedan óvulos y los niveles de AMH descienden a cero por lo que esta hormona se convierte en un marcador de fertilidad en mujeres.

En bebés y niños varones la prueba de AMH se puede usar para comprobar si hay testículos sanos, ver si tienen testículos no descendidos y para obtener más información sobre un bebé que nació con genitales que no son claramente masculinos o femeninos. Por otra parte esta hormona puede mostrar si el bebé tiene algún tejido testicular funcional o tiene información que puede ayudar a diagnosticar las causas del problema, en general la prueba se realiza con otros análisis incluyendo pruebas de cromosoma, otros exámenes hormonales y ecografía para verificar si hay órganos sexuales y glándulas dentro del cuerpo.

Para un bebé o niño varón se le hace una prueba de testículos no descendidos y cuando tiene niveles normales de AMH significa que los testículos del bebé funcionan, pero no están en el lugar correcto esto se puede tratar con cirugía y/o terapia hormonal. Cuando la concentración es poca o ninguna de AMH puede significar que los testículos no funcionan o faltan por completo, esto puede deberse a una variación o mutación en el gen de la hormona, el bebé puede tener órganos reproductores femeninos internos atípicos con genitales masculinos normales.

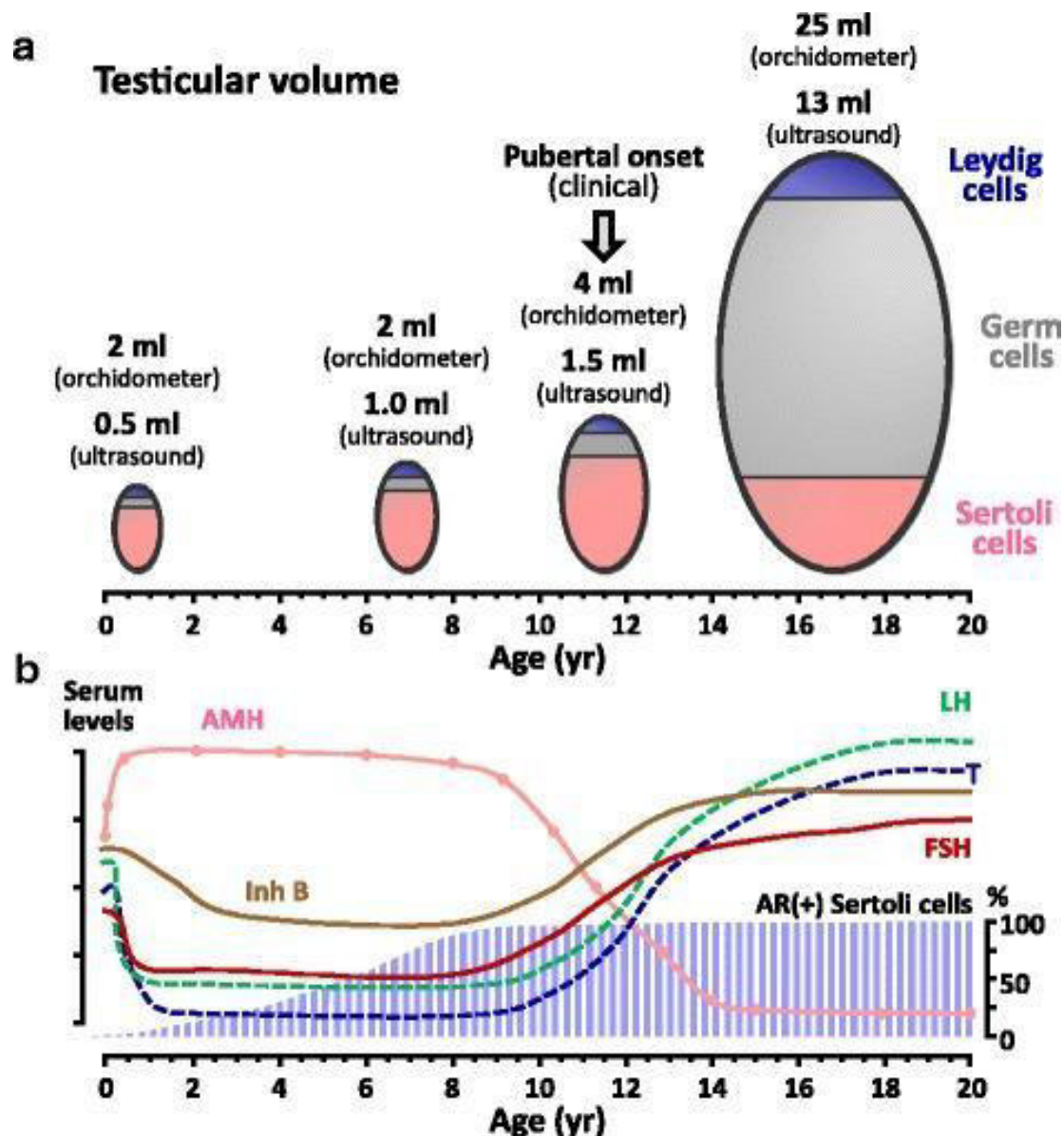


Imagen2: Relación del crecimiento testicular y concentración de hormonas en sangre, según la edad del varón.⁸

5. Relevancia clínica

Se vuelve fundamental, en niños recién nacidos, cuantificar esta hormona, cuando se presenta ambigüedad genital, aun que presenten una alta variabilidad intraindividual. La principal utilidad clínica de AMH en niños se debe a la posibilidad de trastornos en la diferenciación sexual, estas se dan cuando la vía genética del desarrollo gonadal es defectuoso, por lo que la función genética se pierde o se anula.

a. Anomalías genómicas en cromosomas sexuales

Lo primero que se tiene que ver en casos de anomalía en la diferenciación sexual es el hacer una evaluación inicial para ver la presencia de genitales externos anómalos que impiden asignar el sexo masculino o femenino, por lo que obliga a la realización minuciosa de la historia clínica, haciendo un análisis exhaustivo del antecedente familiar, una exploración física detallada y pruebas complementarias. Es necesario obtener los resultados de cariotipo y de 17- hidroxiprogesterona, en el antecedente familiar preguntar sobre exposición prenatal a andrógenos, la virilización materna durante el embarazo, la inestabilidad androgénica familiar, viendo si hay mujeres con amenorrea, muertes de neonatos inexplicadas e historias de consanguinidad.

Cuando hablamos de exploración física nos referimos a los genitales externos (tamaño del clítoris o del pene, separación de los labios mayores, grado de fusión del rafe medio, bolsas escrotales, situación del meato urinario, abocamiento vaginal), la palpación de las gónadas (en bolsas, labios mayores o conducto inguinal) y su posible nivel de descenso, esto nos permite establecer el grado de ambigüedad de acuerdo a los estadios descritos por Prader.

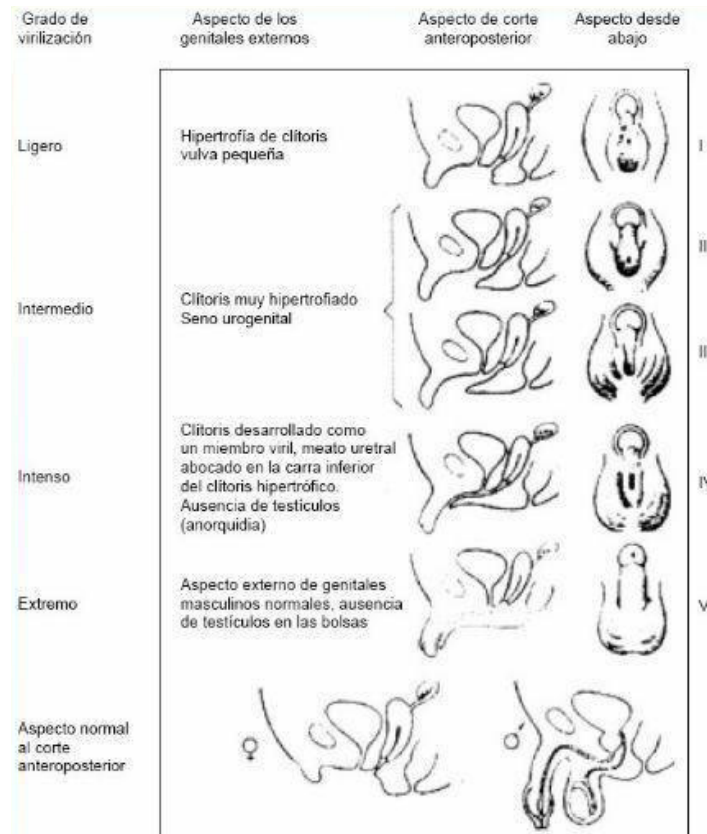


Imagen3: Explicación de los estadios de Prader,

Los trastornos de la diferenciación sexual 46 XY es difícil de diagnosticar, ya que tiene una baja incidencia de aproximadamente un caso cada 1500 recién nacidos, una de las primeras presentaciones se da como genitales mal diferenciados; además se puede ver durante estudios diagnósticos de pubertad retrasada, virilización anticipada o ginecomastia, infertilidad o tumores gonadales.

Junto a las exploraciones físicas es necesario hacer exploraciones complementarias como ser la prueba del cariotipo y el gen SRY. El cariotipo se realiza en sangre periférica de forma urgente (dando el resultado entre 3 a 4 días), no obstante el cariotipo se realiza a partir de leucocitos periféricos, donde se aconseja por lo menos hacerlo estudiando al menos 200 células, debido a la posibilidad de mosaicismo (error en la división celular, en el desarrollo fetal), es necesario también determinarse la existencia del gen SRY, pues su existencia en individuos 46XX (traslocación: desplazamiento de un segmento de un cromosoma a un nuevo lugar en el genoma) producen virilización y su ausencia en 46 XY feminización (delección: pérdida de partes del cromosoma).

Luego de obtener el cariotipo a partir de las 48 horas de vida, debe realizarse estudios, no antes de obtener los datos del cariotipo, solicitando en primera instancia

gasometría venosa, glucosa y ionograma, por otra parte se pide cuantificación de ACTH, cortisol, esteroides suprarrenales y gonadales. Entre las hormonas que se piden también están la 17-hidroxiprogesterona, testosterona, dihidrotestosterona, gonadotropinas basales, como la hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante y por otra parte la hormona Anti-Mülleriana, esta última valora la presencia del tejido testicular. Otros estudios que se realizan son la ecografía abdominopélvica y una resonancia abdominopélvica (aun que esta última requiere sedar al niño).

Según el resultado de los cariotipos las anomalías o trastornos de la diferenciación sexual se pueden clasificar en alguno de estos tres grupos diferentes:

- Anomalías o trastornos de la diferenciación sexual en individuos 46 XX.
- Anomalías o trastornos de la diferenciación sexual en individuos 46 XY.
- Anomalías o trastornos de la diferenciación sexual por alteración de los cromosomas.

Las anomalías de la diferenciación sexual 46XX puede pasar por excesos de andrógenos, como el 17-hidroxiprogesterona, viendo desde el punto del origen fetal la hiperplasia suprarrenal congénita es una causa muy común de la virilización en 46XX, la causa más común se da por la 21-hidroxilasa y además se ve un aumento de la ACTH y andrógenos suprarrenales. Además existen otros déficit de enzimáticos que cursan con elevación de esta hormona y genitales ambiguos en individuos XX. Otra causa en el origen fetal es el déficit de 11-beta-hidroxilasa, produciendo genitales ambiguos elevando la tensión arterial por aumento de la desoxicorticosteron con actividad mineralocorticoide (por esto no hay síndrome pierde-sal) y supresión de la renina. El déficit de 17-beta-hidroxisteroideshidrogenasa cursa con un aumento de la 17-hidroxiprogesterona y la dihidrotestosterona que produce la ambigüedad genital en sujetos 46XX, 46XY y síndrome pierde-sal. Por otra parte la causa también puede ser de origen materno, en donde primeramente hay que descartar tumores maternos virilizantes como el luteoma, quiste teca-lutenícos, tumores suprarrenales, etc. En anomalías de la diferenciación sexual 46XX, por anomalías del desarrollo gonadal si los estudios previos son negativos deben realizarse una laparoscopia y con biopsia gonadal, para llegar al diagnóstico de confirmación de disgenesia gonadal, 46XX idiopático (tiene ovarios), ovotestes o anomalías de la diferenciación sexual testicular. La causa de ovotestes en 46 XX son por ejemplo la presencia del gen SRY o duplicación del gen SOX9; mutación de genes autonómicos o del cromosoma X que permite la determinación testicular incompleta aún en ausencia del gen SRY; o

también la existencia de una línea celular ignorada que lleva todo o parte del cromosoma Y.

Sobre todo nos enfocamos nosotros en las anomalías o trastornos de la diferenciación sexual en individuos 46 XY, ya que el diagnóstico para estas enfermedades en este tipo de individuos es más complicado debido a la gran variabilidad fenotípica o el número extenso de causas que pueden originarlas.

Existe un test de estímulo con gonadotropina coriónica que ayuda a su diagnóstico, cuando se usa como marcador la hormona Anti-Mülleriana, ya que es un marcador de la existencia de tejido testicular. El test mencionado aprovecha el eje hipotálamo-hipófiso-ovárico o hipotálamo-hipófiso-testicular para poder a ver una relación entre la concentración otorgada de hormona y el aumento, disminución o conservación de la concentración de las hormonas que se generan, por lo que si se presenta una alteración este eje hipotálamo-hipófiso-gonadal se va a obtener evidencia para el diagnóstico.

La anomalía en la diferenciación sexual del cromosoma 46XY con respuesta anormal de testosterona al test de estímulo con beta-HCG, es ahí donde entra en juego la hormona Anti-Mülleriana, debido a que cuando la hormona se encuentra en niveles normales, junto con la ACTH normal:

- Puede existir una hipoplasia/aplasia de las células de Leydig por mutación del gen. Con niveles elevados LH, y disminución de la síntesis de testosterona. No obstante niveles normales descartan alteraciones enzimáticas suprarrenales, pero la relación de la testosterona con androstendiona menor a uno nos lleva a el diagnóstico que se va a terminar de confirmar con biopsia gonadal y estudios moleculares.
- Alteración enzimática testicular de la síntesis de testosterona, donde se ve una alteración en la enzima 17-Beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa que produce niveles de testosterona disminuidos y androstendiona elevada, estos son precursores previos al bloqueo enzimático otra cosa que se ve es que la relación testosterona y androstendiona es menor a 0,8-1; luego del test de estímulo y se ve que la AMH se encuentra normal o elevada y la ACTH permanece en niveles normales. Con el test de ACTH normal podemos descartar un fallo de suprarrenal y requiere confirmación con estudio molecular del gen.

En otros casos donde están los niveles normales de ACTH, pero con AMH disminuida:

- Se ve la presencia de disgenesia pura.
- Se ve la presencia de disgenesia parcial.
- Síndrome de regresión testicular.

En los tres casos se cursa con valores nulos o disminuidos de testosterona tanto basal como tras estímulo de beta-HCG, pero AMH prácticamente indeterminable. Además requiere de biopsia y estudios del gen SRY, para el diagnóstico certero.

Cuando se encuentra la ACTH elevada o alterada y AMH se puede ver en niveles normales, podemos diferenciar entre:

- Un déficit de 3-betahidroxiesteroide deshidrogenasa, que produce genitales ambiguos en sujetos XX induciendo una acumulación de la dihidrotestosterona, pero en sujetos XY donde hay un defecto de la virilización, por fallo en la conversión de la dihidrotestosterona en androstendiona a precursores de la testosterona; no obstante también se ve en estos individuos el síndrome de pierde-sal, donde aumenta la renina y disminuye la aldosterona, más que nada este defecto se diferencia por el aumento de la de la ratio-17-hidroxiprogesterona en relación con la 17-hidroxiprogesterona y del cociente entre dihidrotestosterona y androstendiona después de un estímulo con ACTH y cursando con AMH normal.
- Un déficit del nivel de la enzima 17-hidroxilasa/17-20liasa, que está produciendo falta de virilización en el varón junto con hipertensión arterial e hiperpotasemia, cursando con aumento de la relación entre progesterona y la 17-hidroxiprogesterona.
- Una hiperplasia lipoidea congénita cuando los genitales ambiguos o fenotipo externo femenino en 46XY; cursa con déficit generalizado de todos los precursores suprarrenales, con disminución en la producción de andrógenos e insuficiencia suprarrenal, por lo que también con disminución del cortisol y síndrome pierde- sal.

Cuando haya anomalías de la diferenciación sexual 46XY con respuesta normal de la testosterona al test de estímulo con gonadotropina humana, beta-HCG y restos de AMH ausentes podemos ver:

- Una ausencia de andrógenos, siendo esta la causa más frecuente, el feto presenta falta de masculinización por alteración del receptor de los andrógenos en los tejidos periféricos. Presenta gónadas masculinas, LH, testosterona basal y tras estímulo con beta-HCG, así como la dihidrotestosterona, están en niveles

normales; este caso requiere estudios moleculares del gen del receptor androgénico para llegar al diagnóstico.

- Un déficit de 5- α -Reductasa, el cual impide la formación de la dihidrotestosterona a partir de la testosterona, por lo que induce a la falta de virilización, donde se ve la testosterona en niveles basales, tras el estímulo con beta-HCG, normales. El cociente entre testosterona y dihidrotestosterona es mayor a 10 tras el estímulo, por esto presentan gónadas masculinas bilaterales intactas, pero fenotipo femenino, el estímulo molecular confirma el diagnóstico.

Cuando tengo restos de AMH presentes puede existir:

- La alteración del gen de la hormona Anti-Mülleriana y del gen que codifica para el receptor de la misma, esto nos lleva a que el desarrollo de las estructuras Müllerianas y ambigüedad genital de individuos 46XY con gónadas bilaterales masculinas, generalmente criptorquidia (donde los testículos no se mueven a su posición correcta en el escroto antes del nacimiento) o hernia útero inguinal donde vemos la testosterona basal y tras estímulo, siendo normal, existiendo hormona Anti-Mülleriana anormalmente elevada por alteración del gen del receptor o muy disminuida por alteración del gen de la hormona; para su correcto diagnóstico necesitamos estudios moleculares del gen afectado.
- Ovotestes, donde se ve la presencia de tejido ovárico y testicular con testosterona en niveles masculinos.

El síndrome de Klinefelter es una causa común de hipogonadismo primario de inicio tardío, asociado con desórdenes cromosómicos caracterizado por la existencia de un cromosoma X extra, tiene una incidencia de 150 por cada 100.000 varones. La causa es una aneuploidia de los cromosomas sexuales donde se encuentra un cariotipo 47XXY, en un 80% de los casos, aunque a nivel testicular se presentan células germinales que sufren un rápido proceso de degeneración y una deficiencia de la producción de testosterona. Clínicamente los pacientes presentan ginecomastia, testículos pequeños y firmes, proporciones corporales eunocoides (es una variante del eunoquismo, por insuficiencia de la secreción en los testículos), azoospermia (ausencia total del espermatozoides en el fluido eyaculado durante el orgasmo) y niveles aumentados de gonadotropinas con niveles disminuidos de testosterona. Clínicamente hay casos donde el hipogonadismo se evidencia después de la pubertad.

b. Otras anomalías con relevancia clínica

Otra de las enfermedades que necesita diagnóstico mediante la medida de la AMH es el hipogonadismo central, más específicamente hablando el hipogonadismo masculino en la edad pediátrica hace referencia a una disminución de la actividad gonadal esperada por la edad que implica una secreción alterada de las hormonas por la célula Sertoli o por las células de Leydig o por un trastorno de la espermatogénesis. Esta enfermedad se caracteriza por presentar principalmente déficit de testosterona y clínicamente por la ausencia de la adquisición de los caracteres sexuales secundarios e infertilidad. La alteración se encuentra básicamente a nivel hipofisario o hipotalámico mientras que el hipogonadismo primario, la alteración se encuentra en niveles gonadales, este último a diferencia de la edad adulta, rara vez es hipergonadotrópico en la infancia. El hipogonadismo primario suele ser congénito, asociado a síndromes o alteraciones genéticas; o adquirido, secundario a traumas, radiación o tumores. Se llega a sospechar de un hipogonadismo central cuando hay presencia de características clínicas referidas a la criptorquidia, como ser la presencia de micropene o coexistencia de otras deficiencias hormonales hipofisarias. Por lo general presenta niveles bajos de testosterona que se reflejan en la ausencia de la estimulación de las células de Leydig por parte de la LH en individuos prepuberales y puberales con hipogonadismo central tienen los niveles en sangre de AMH bajos por la falta de estímulo de FSH en las células de Sertoli, en la vida fetal y neonatal, pero los niveles normales no excluyen el diagnóstico.

Estudios demostraron que pacientes con hipogonadismo central que se tratan con FSH recombinante aumentan los niveles de AMH y que al adicionar gonadotropina coriónica humana, los niveles disminuían drásticamente como respuesta al aumento de la testosterona intratesticular, asemejando a los cambios fisiológicos observados en la pubertad. Cuando pacientes solamente reciben tratamiento con testosterona no ocurre lo mismo, ya que los niveles intratesticulares de la misma son insuficientes para generar retroalimentación negativa, por lo que esto nos lleva a ver que AMH es una buena herramienta para evaluar la respuesta del tratamiento con FSH en estos pacientes.

En este síndrome los niveles de AMH son normales durante la infancia y en la pubertad temprana, de igual manera que los niveles de la inhibina B y la FSH, cuando estos pacientes entran a la edad puberal los niveles séricos de la hormona se encuentran en igual concentración que niños normales; aunque luego se produce la

disfunción progresiva de las células de Sertoli, lo que conlleva a la disminución de la hormona a niveles extremadamente bajos o indeterminables correlacionados con la disminución de la inhibina B y el aumento del FSH, también un volumen testicular pequeño.

El macroorquidismo se da cuando el volumen y desarrollo testicular es mayor que el que corresponde para la edad prepuberal, vamos a ver un aumento de la producción de AMH en estos casos. Informes demuestran que esto se da en ausencia de características sexuales dependientes de la secreción de andrógenos. En estos casos la mutación activadora somática del gen *GNAS1*, que codifica para las proteínas $Gs\alpha$, involucrada en la vía de la transducción de la FSH, resultando en una hiperproliferación e hiperfunción de las células de Sertoli, que como ya se ha mencionado son las que sintetizan la AMH.

Los tumores de la célula de Sertoli pueden diagnosticarse gracias a la ayuda de la Inmunohistoquímica de la AMH, siendo útil para identificar el origen de los tumores testiculares, tumores primarios o metastásicos de las células granulosas de los testículos, incluso en la proliferación intratubular de las células de Sertoli, considerada una etapa inicial de los tumores de las células. Para el diagnóstico inicial de estos tumores la determinación de AMH sérica no es útil porque sus niveles altos se presentan normalmente en la edad puberal, pero un aumento paulatino de sus niveles podría ser sugestivos de una lesión progresiva.

Las terapias oncológicas que reciben ciertos pacientes con cánceres, pueden producir alteraciones endocrinas a lo largo de su vida, siendo los más frecuentes alteraciones en el eje del crecimiento y en las gónadas, son las que comúnmente presentadas son la toxicidad gonadal inducida por quimio o radioterapia, va a depender del tipo de terapia utilizada, la dosis y la edad del paciente; en pacientes con terapia gonadotóxica, como cisplatino o busulfán, afectan los niveles de AMH encontrándose disminuidos, al igual que los niveles de inhibina B y FSH puede estar aumentado. Ciertos investigadores demostraron que la medición de AMH es útil para determinar la presencia de una deficiencia gonadal primaria por ausencia de gonadotropinas, inducida en pacientes expuestos a tratamientos con radioterapia.

La criptorquidia es la anomalía genética más común en recién nacidos masculinos, esta afecta aproximadamente al 5% de los recién nacidos a término y hasta el 45% de los recién nacidos pretérmino al final del primer año de vida, hasta el 70% de los casos pueden resolverse de forma espontánea; estudio demostraron que en niños con

gónadas no palpables bilaterales, pueden usar la AMH para diferenciar adecuadamente la presencia de testículos no descendidos, cuando está en rangos normales dicha hormona, se detecta la disfunción de las células de Sertoli en la que están bajos y la anarquía en la cual son indetectables de forma más sensible, siendo más específica que la testosterona, es por esto que la hormona se utiliza como prueba dinámica de estimulación con gonadotropinas para confirmar la presencia o ausencia de testículos.

La AMH se puede utilizar para diagnosticar problemas en la pubertad tanto la precoz como la retrasada. Llamamos pubertad precoz al desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en un varón antes de la edad habitual de aparición, en general antes de los 9 años, mientras que se llama pubertad retrasada cuando se ve en los varones una ausencia del aumento en el tamaño testicular por encima de 4mL alrededor de los 14 años de edad sin tener en cuenta la presencia o ausencia de vello púbico; para definirla en la pubertad precoz los niveles de AMH disminuyen igual a cómo ocurre durante una pubertad normal, con el mismo patrón de retroalimentación negativa secundaria al aumento de los niveles de andrógenos. La medición de dicha hormona es útil en niños con signos no tan claros de pubertad precoz como el aumento del volumen testicular a 3mL, sin crecimiento peneano, por lo que los niveles de gonadotropinas y testosterona no pueden estar aumentados; se demostró que la hormona es útil durante el seguimiento del tratamiento con análogos de GnRH en niños con pubertad precoz central, en los que sus niveles regresan a los normales para la edad puberal, en niños menores a un año esta hormona no muestra utilidad, ya que sus niveles no disminuyen por la falta de expresión de los receptores androgénicos en las células de Sertoli en la primera infancia, haciéndolo insensible transitoriamente a los andrógenos se demostró que la falta de adherencia al tratamiento con análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas, genera que los niveles de la AMH no se normalicen como se esperaba, debido a que se inhibe de manera intermitente a la producción de testosterona.

En pacientes que presentan pubertad retrasada suele darse por retraso constitucional del desarrollo un estado no patológico en el cual la madurez del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal está retrasada o hipogonadismo hipogonadotrópico, generalmente secundario a una alteración a nivel central que resulta en concentraciones bajas de FSH y LH. Por otra parte también puede ser por hipogonadismo hipergonadotrópico en el que se presenta una incapacidad a nivel

gonadal para producir esteroides sexuales y se caracteriza por elevados niveles de FSH y LH, normalmente en estos pacientes se encuentran los niveles de AMH normales prepuberales, pero estudios demostraron que la medición de AMH es útil al momento de diferenciar entre un retraso constitucional del desarrollo y un hipogonadismo central en cada caso los niveles de la hormona están por encima de lo esperado para la edad, porque no hay una regulación por parte de la testosterona intratesticular, pero disminuyen en comparación a lo esperado en niños prepuberales, porque no hay estimulación de las células de Sertoli por la FSH.

Como prueba de laboratorio la medición de la hormona Anti-Mülleriana no es suficiente para establecer un diagnóstico particular en los varones, los resultados se tienen que interpretar teniendo en cuenta los hallazgos clínicos y los resultados de otras pruebas pertinentes. No obstante, es necesaria para poder llegar a un diagnóstico preciso.

6. Especificaciones del método empleado

Existen diferentes métodos empleados para la cualificación y cuantificación de hormonas en muestras biológicas, como ser inmunoensayos: RIA, ELISA, Inmunoblotting (western blot), Inmunofluorescencia, Citometría de Flujo o CLIA. Para analizar muestras se utilizan diferentes ensayos comerciales, en la medición de AMH. El desarrollo de estos ensayos en AMH ha permitido ampliar su utilidad como marcador bioquímico.

En este trabajo el método usado para medir la AMH es un Inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) de *BECKMAN COULTER ACCESS, Immunoassays Systems*. En dichos ensayos la unión antígeno-anticuerpo se mide a través de la fluorescencia que se genera mediante una reacción química. Los ensayos CLIA tiene un inconveniente, necesitan equipos específicos para la lectura de la fluorescencia (equipamiento de alto costo), pero esto se puede compensar, ya que tiene la ventaja de ser significativamente más sensible que las determinaciones por ELISA tradicionales. Esta característica le permitió ganar terreno en diferentes campos, tanto de análisis, como de investigación.

CLIA y ELISA parten del mismo fundamento técnico, la diferencia está en los CLIA, debido a que la enzima acoplada al anticuerpo de detección cataliza una reacción quimioluminiscente que resulta en la emisión de fotones produciendo luz en vez de un

cambio de color visible comparándolo con otros métodos analíticos, la luminometría proporciona una sensibilidad excepcionalmente alta, con un amplio rango de detección y el uso de instrumentación de bajo costo. El sustrato de estos inmunoensayos pasa a ser una pieza clave en la reacción, porque nos permite medir los resultados con precisión utilizando sustrato luminiscentes como luminol o el ester de acridinio, que brilla tras la reacción permitiendo medir la emisión de luz, mediante esta técnica podemos detectar concentraciones de hasta 1 pg/ml utilizando técnicas ultrasensibles. Los ensayos CLIA cuentan con un mayor rango dinámico en comparación a otros métodos por lo que es considerablemente más preciso; usa reactivos altamente estables y su bajo fondo lo hace fácil de automatizar, permite hacer lecturas de resultados con un período amplio de tiempo después de realizar el ensayo.

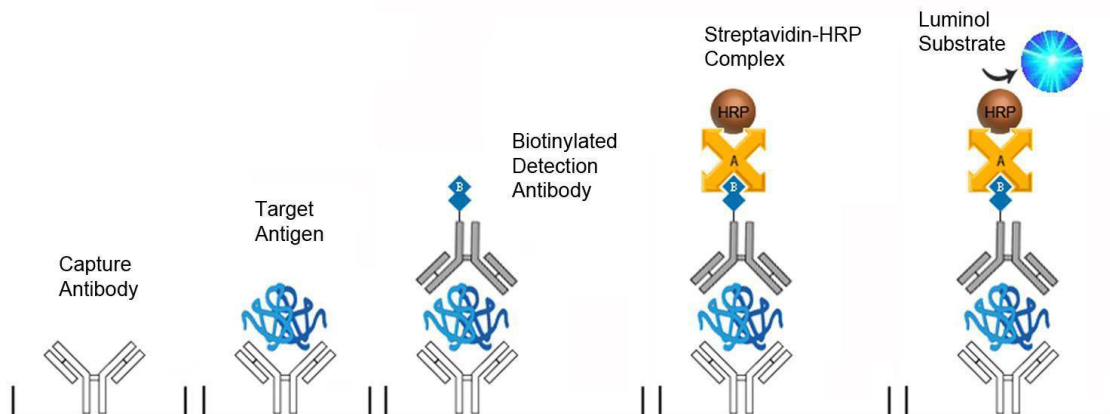


Imagen4: Corresponde al ensayo utilizado por *BECKMAN COULTER ACCESS, Immunoassays Systems*.¹²

7. Intervalos de referencia

Los IR son parte importante en la interpretación de los procedimientos analíticos, son de suma importancia en la interpretación clínica de la enfermedad y el grado de esta, orientando el diagnóstico médico. Los IR se refiere a los límites, superior o inferior que incluye al 95% de una muestra de individuos de referencia, aparentemente sanos, con el cual se puede contrastar los resultados de los análisis y permite su interpretación.

8. Revalidación del método

Tradicionalmente, los IR son tomados de los insertos (protocolo de trabajo) que acompañan al reactivo con el que se procesa la muestra; pero en la mayoría de los casos, los IR propuestos por el fabricante corresponden a una evaluación realizada en condiciones y población distinta a la evaluada en nuestros laboratorios. Por ello es de suma importancia que los IR sean verificados antes de ser incluidos en nuestro sistema de información, debido a que son indispensables para una correcta interpretación de resultados de los exámenes de laboratorio. Entendiendo que los IR verificados, servirán para una interpretación más confiable de los resultados del paciente. Sin embargo, no se ha establecido un rango de referencia universal para la hormona Anti-Mülleriana, por lo que cada laboratorio debe plantear sus propios valores de acuerdo con el método usado y la población de estudio, teniendo en cuenta las variaciones que presentan los niveles de la hormona según la edad y el sexo.

Para transferir el intervalo de referencia brindado por el fabricante se debe elegir una población de 20 individuos representativos. Una vez realizadas las determinaciones, si hasta 2 resultados tienen valores que están por fuera del IR brindado por el fabricante, entonces podremos aplicar dicho intervalo a la población hospitalaria, es decir, podremos transferirlo.

De lo contrario es necesario realizar el estudio sobre un N mayor a 20.

OBJETIVOS

Generales

Verificar si el intervalo de referencia comercial de AMH propuesto por *ACCESS*

Immunoassays Systems, BECKMAN COULTER se ajusta y es transferible a la población pediátrica de estudio.

Específicos

Comparar que los valores del fabricante coinciden y sirven para evaluar a los pacientes, en este caso a muestras de recién nacidos varones y mujeres, de 0-60 días de vida.

MATERIALES Y METODOS

✓ Para realizar este trabajo:

El material biológico que se utilizó fue muestras de sangre venosa, obtenida por venopunción de los pacientes y colocándolos en los tubos correspondientes para obtener plasma con heparina de litio, con la debida centrifugación, según indique el fabricante de los tubos de muestra, además se tuvo en cuenta las precauciones para de conservación y procesamiento de las muestras.

Estas muestras fueron de pacientes, 20 varones y 20 mujeres, de 0-60 días de vida, que no tengan una patología previa asociada a una disfunción gonadal (criterio de exclusión), que asisten *Laboratorio de Endocrinología del Hospital de Niños "SSM Ludovica" de La Plata*.

Para poder analizar todas las muestras correctamente, sabiendo que los recién nacidos varones presentan altas concentraciones de AMH, se les realizo una dilución de 1 en 10 (25 µl de muestra y 225 µl de diluyente A, provisto por el fabricante del método junto con los reactivos), la cual se dejó programada en el equipo, por lo que los datos obtenidos, incluían esta consideración.

✓ Inmunoensayo quimioluminiscente:

Para la realización de este trabajo se utilizo el *BECKMAN COULTER ACCESS, Immunoassays Systems*, que utiliza partículas paramagnéticas para la determinación cuantitativa del estudio realizado sobre AMH. En este caso el equipo utiliza utiliza un método de detección y cuantificación de antígenos, específicamente un ELISA no competitivo directo de captura, tipo sándwich. Se añade muestra en un recipiente de reacción con anticuerpos monoclonales anti-AMH de ratón conjugado con fosfatasa alcalina en tampón MES, solución salina tamponada TRIS con proteínas y partículas paramagnéticas recubiertas con un anticuerpo anti-AMH monoclonal de raton TRIS. Luego de que el recipiente de reacción se incubaba, los materiales ligados a la fase solida se mantienen en un campo magnético en lo que los materiales no ligados se limpian. La cuantificación de la muestra se puede hacer basados en una curva de calibración de múltiples puntos que esta previamente almacenada en el equipo.⁵

RESULTADOS

Este trabajo se realizo sobre dos poblaciones distintas: utilizando un N=20.₁₂

- RESULTADOS OBTENIDOS:

Valores de AMH en niños		
Muestr a	Edad en días	Resultados en ng/ml
1	12	58,5
2	13	29,9
3	14	36,57
4	15	61,47
5	15	31,6
6	16	53,12
7	19	64,96
8	22	23,54
9	23	181,7
10	23	108,04
11	24	85,06
12	25	64,88
13	27	139,67
14	30	48,1
15	35	89,4
16	37	92,1
17	39	97,65
18	52	86,83
19	61	52,9
20	63	80,76

Tabla1: Se observan los resultados obtenidos para la medición de hormona Anti-Mülleriana en 20 muestras de varones.

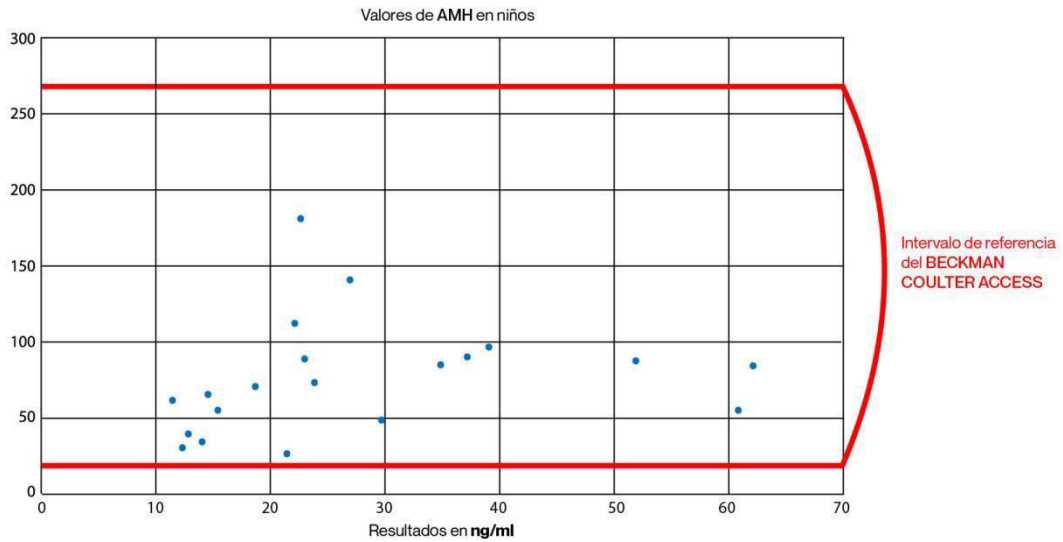


Gráfico 1: Datos obtenidos de los 20 niños en la experimentación con los IR del fabricante.

AMH en niños				
2SD	1SD	Media	1SD	2SD
26,56	29,58	74,33	141,74	161,39

Tabla 2: Datos obtenidos desde excel. Primer y segundo desvío estándar para los niños.

Valores de AMH en Niñas		
Muestra	Edad en días	Resultados en ng/ml
1	60	2,03
2	46	0,1
3	52	2,42
4	16	4,49
5	14	0,17
6	56	1,35
7	25	0,35
8	25	1,58
9	16	0,06
10	17	0,16
11	59	2,28
12	4	0,34
13	21	0,18
14	59	3,03
15	21	0,06
16	50	2,85
17	32	0,08
18	10	0,06
19	59	0,16
20	32	2,14

Tabla 3: Se observan los resultados obtenidos para la medición de hormona antimülleriana en 20 muestras de mujeres.

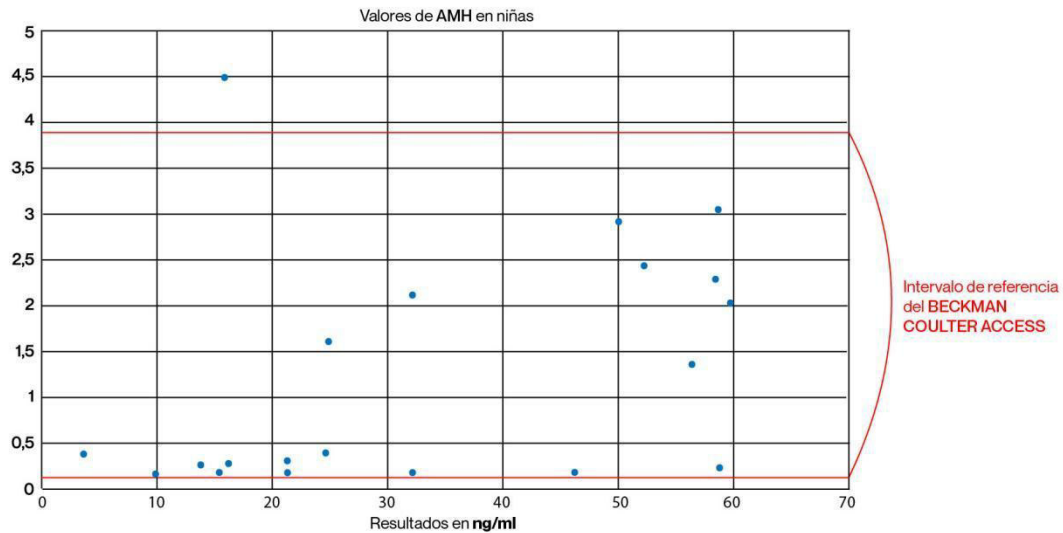


Gráfico 2: Datos obtenidos de los 20 niñas en la experimentación con los IR del fabricante.

AMH en niñas				
2SD	1SD	Media	1SD	2SD
0,06	0,06	1,19	3,10	3,76

Tabla 4: Datos obtenidos desde excel. Primer y segundo desvió estándar para los niñas.

Grupo de referencia de niños	Intervalo de edad (días)	N	Media ng/mL (pmol/L)	Intervalo de referencia del 95 % ng/mL (pmol/L)
Varones	≤ 60	55	46,94 (335,17)	15,11-266,59 (107,92-1903,49)
Mujeres	≤ 60	44	0,16 (1,17)	0,01-3,39 (0,04-24,19)

Tabla 4: Referencia del *ACCESS Immunoassays Systems, BECKMAN COULTER*.

DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó una comparación entre los datos obtenidos en la experimentación respecto a los datos proporcionados por el fabricante, si vemos la tabla 3, adjuntada desde el inserto del fabricante, en comparación con los intervalos de referencia obtenidos en la experimentación, podemos notar que el intervalo de referencia que se ven en la tabla 4, son más ajustados. Debido que al momento de obtener los datos de variación vemos que el fabricante tiene un N mayor al nuestro, por lo que es ahí donde se ve la diferencia entre el intervalo de referencia en este caso. En el caso de los niños podemos ver que todos los datos obtenidos quedan dentro del intervalo de referencia del fabricante, mientras que el de las niñas tenemos solo un dato fuera del intervalo de referencia, pero teniendo en cuenta las pautas de revalidación podemos seguir con la experimentación con un N=20, sin excluir el dato.

CONCLUSIÓN

Mediante este trabajo se pudo verificar el intervalo de referencia propuesto por el fabricante comercial, BECKMAN COULTER ACCESS Immunoassays Systems, para AMH. De acuerdo con las pautas de revalidación, podemos decir que dicho intervalo se ajusta y es transferible a la población pediátrica de estudio, del laboratorio central del Hospital de niños, Sor María Ludovica, de La Plata.

A partir de este estudio, el Laboratorio de Endocrinología de dicha Institución cuenta con una herramienta para asegurar que el IR utilizado para la determinación de AMH es adecuado para su población, especialmente de recién nacidos hasta los dos meses de vida, incrementando la utilidad diagnóstica del reporte de resultados.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Sadler, L. (2007). *Embriología Medica con orientación clínica*. Bogota: Panamericana.
2. Mezquita, C. (2018). *Fisiología Medica*. : Medica Panamericana.
3. Aldo R. Eynard, Mirta A. Valentich, Roberto A. Rovasio, . (2016). *Histología y Embriología Humanas*. : Medica Panamericana.
4. Calandra R. y Rulli S., . (2015). *Fisiopatología Molecular y Clínica Endocrinológica*. : Eli Lilly Interamericana.
5. Beckman Coulter, Inc., . (2015). Access AMH. *Instrucciones de uso*, (), 1-14.
6. Wayne, . (2008). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; proposed guideline. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, (Third Edition CLSI document C28-P3).
7. Lasprilla-Tovar, J. (2017). *La clínica y el laboratorio*. Colombia: Editorial Medica Colombiana S.A..
8. Edelsztejn NY, Grinspon RP, Schteingart HF, Rey RA., . (2016). Anti-Mullerian hormone as a marker of steroid and gonadotropin action in the testis of children and adolescents with disorders of the gonadal axis. *Int J Pediatr Endocrinol*.
9. Dra. C. Alonso. (2011). *Desordenes del desarrollo sexual*. Yumpu. . Recuperado de <https://www.yumpu.com/es/document/read/15915325/desordenes-del-desarrollo-sexual/5>
10. Pelayo Baeza FJ, Carabaño Aguado I, Sanz Santaefemia FJ, La Orden Izquierdo E. Genitales ambiguos. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 2011;13:419-33.
11. Muñoz Anadón, An. (2017). Los intervalos de referencia biológicos. biological reference intervals.

12. Ozarda, Y. (2016). Reference Intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochemia Medica*.
13. Abyntek. (23 de mayo del 2019). *Tipos de inmunoensayos*. Recuperado de <https://www.abyntek.com/tipos-de-inmunoensayos/>