

PATOLOGÍA ADRENAL

Interpretación de los parámetros bioquímicos de función suprarrenal en edades pediátricas

Interpretation of adrenal function biochemical parameters in paediatrics

Laura Audí Parera

Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España

Resumen

Los parámetros bioquímicos de función suprarrenal incluyen la bioquímica general y determinaciones de hormonas relacionadas con el funcionamiento del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal. La ontogenia del funcionalismo de este eje presenta diferentes periodos, desde el desarrollo fetal hasta el adulto joven, de modo que es necesario conocerlos con el fin de poder interpretar los resultados proporcionados por los análisis hormonales.

En la sangre periférica podemos medir las concentraciones de hormona adrenocorticotropa, de cortisol y de aldosterona, así como de la mayor parte de sus precursores. En la saliva y en la orina se puede apreciar la fracción del cortisol libre de proteínas plasmáticas. Las mediciones de la renina y de la actividad de la renina permiten conocer el estado del eje renina-angiotensina-aldosterona. Además de mediciones en condiciones basales, puede ser necesario realizar pruebas dinámicas de estimulación o de supresión de la secreción.

Las técnicas utilizadas por el laboratorio de hormonas para la medición de hormonas peptídicas y esteroideas de indicación más frecuente son inmunoensayos automatizados que permiten la obtención rápida de resultados con suficiente sensibilidad y especificidad. Sin embargo, en el caso de los esteroides, algunas mediciones por inmunoensayo no son suficientemente específicas o no están ni tan siquiera comercializadas. Además, los esteroides se metabolizan y excretan en la orina, y constituyen un metaboloma de esteroides de gran utilidad diagnóstica y terapéutica. Las técnicas de cromatografía líquida o de gases

acoplada a espectrofotometría de masas permiten la medición más específica y simultánea de esteroides, tanto plasmáticos como urinarios.

Palabras clave: ACTH; actividad de la renina; aldosterona; cortisol; eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal; esteroideogénesis; renina.

Abstract

Adrenal function biochemical parameters include a general biochemistry and measurement of hormones involved in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis function. Ontogenesis of this axis presents different periods, from fetal development to adulthood, and it is necessary to interpret hormonal results considering each period.

In peripheral blood, we can measure concentrations of ACTH, cortisol and aldosterone as well as most of their precursors. In saliva and urine, we can appreciate the cortisol fraction that circulates unbound to plasma proteins. Renin activity and renin measurements inform on the functional state of the renin-angiotensin-aldosterone axis. In addition to baseline measurements it can be necessary to perform dynamic tests to stimulate or to suppress secretions.

Techniques used by the hormonal laboratory to measure the most frequently indicated peptide and steroid hormones are automated immunoassays that yield rapid results with sufficient sensitivity and specificity. Nevertheless, in the case of steroids, some immunoassays are not sufficiently specific or are not even commercialised. In addition, steroid hormones are metabolised and excreted in the urine,

thereby rendering the analysis of the urinary steroid metabolome a source of useful diagnostic and therapeutic information. Liquid or gas chromatography coupled to mass spectrometry afford the most specific and simultaneous steroid measurements, in plasma or in urine.

Keywords: *Hypothalamo-pituitary-adrenal axis; ACTH; cortisol; aldosterone; renin; renin activity; steroidogenesis.*

Introducción

Estudiar a un paciente pediátrico en el que se pueda sospechar alguna anomalía en su función suprarrenal requiere actuaciones multidisciplinares, entre las cuales, además de la exploración y la descripción clínicas, son siempre necesarios análisis bioquímicos, a veces también de imagen, y estudios moleculares cuando la causa pueda ser genética.

Los parámetros bioquímicos de función suprarrenal incluyen la bioquímica general y determinaciones de hormonas relacionadas con el funcionamiento del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal. La ontogenia del funcionalismo de este eje presenta diferentes períodos, desde el desarrollo fetal hasta el adulto joven, de modo que es necesario conocerlos con el fin de poder interpretar los resultados proporcionados por los análisis hormonales.

Hormonas del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal y ontogenia

El eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal comporta la secreción por células hipotalámicas del factor corticotropo (corticoliberina [CRH]) y su acción sobre las células hipofisarias adrenocorticotropas, la secreción por estas células del precursor proopiomelanocortina, su procesamiento que da lugar a la hormona adrenocorticotropa (ACTH), la acción de esta última sobre las células suprarrenales, la secreción de esteroides por la glándula suprarrenal (precursores y cortisol como principal glucocorticoide y aldosterona como principal mineralocorticoide), la secreción de renina y de angiotensina I, las acciones del cortisol y de la aldosterona que regulan numerosos procesos metabólicos y, a su vez, la propia secreción de CRH, ACTH y de renina ⁽¹⁾.

1. Desarrollo hipotalámico-hipofisario y secreción de hormona adrenocorticotropa

El péptido CRH es sintetizado en los cuerpos neuronales del núcleo paraventricular del hipotálamo, circula por los axones neuronales a través de la eminencia media y es liberado a la circulación portal que lo transporta a la hipófisis anterior, donde, tras unirse al receptor CRHR, expresado en las células hipofisarias, estimula la síntesis del péptido proopiomelanocortina, precursor de la

ACTH. Este péptido es procesado por una enzima convertasa y da lugar a varios péptidos, entre los que se hallan la lipotropina, la β -endorfina, la hormona estimulante de los melanocitos y la ACTH, cuya forma natural circulante en la sangre periférica contiene, predominantemente, 39 aminoácidos. El desarrollo del lóbulo anterior de la hipófisis es complejo (deriva del ectodermo oral y está ya formado hacia las cinco semanas) y requiere la expresión coordinada de una serie de factores de transcripción ⁽²⁾. Entre ellos, para la diferenciación de las células hipofisarias que van a expresar el péptido proopiomelanocortina es necesaria la expresión local del factor de transcripción TBX9 (*T-box transcription factor-19*), previamente denominado TPIT ^(3,4). Aunque se detecta ACTH en la hipófisis fetal hacia la séptima semana de vida fetal, su acción trófica para el mantenimiento de la suprarrenal fetal comienza a ser importante después de los 4-5 meses.

2. Esteroidogénesis suprarrenal y metabolismo de los esteroides

La activación de la esteroidogénesis suprarrenal corre a cargo de la ACTH, la cual interactúa con el receptor MC2R (*melanocortin receptor 2*), y también es necesaria la presencia de MRAP (*melanocortin 2 receptor accessory protein*) para la transmisión de señal y la activación del transporte del colesterol al interior de la mitocondria (proteína StAR, *Steroidogenic Acute Regulatory protein*).

Las células de la corteza suprarrenal sintetizan hormonas esteroideas, dependiendo de las actividades enzimáticas en ellas expresadas. Así, en las células de la zona fasciculada se sintetiza cortisol como principal glucocorticoide; en las de la zona glomerular, aldosterona como principal mineralocorticoide; mientras que la zona reticular sintetiza principalmente el precursor deshidroepiandrosterona (DHEA) (Figura 1). El 7-deshidrocolesterol es transformado en colesterol por la 7-deshidrocolesterol reductasa (gen *DHCR7*), el colesterol es transportado al interior de las mitocondrias por la proteína StAR (gen *STAR*), allí el colesterol es transformado en pregnenolona por la enzima colesterol desmolasa (gen *CYP11A1*), ésta puede ser transformada (ya fuera de la mitocondria, en el retículo endoplasmático) en 17-OH-pregnenolona (enzima 17- α -hidroxilasa; gen *CYP17A1*) o en progesterona (P) (enzima 3- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa de tipo 2; gen *HSD3B2*) y la P en 17-hidroxiprogesterona (17-OH-P) (enzima 17- α -hidroxilasa; gen *CYP17A1*). La P prosigue hacia la síntesis de mineralocorticoides al transformarse en 11-desoxicorticosterona (DOCA) (enzima 21-hidroxilasa o *CYP21A2*; gen *CYP21A2*) y la DOCA es transformada en corticosterona (enzima 11- β -hidroxilasa

de tipo 1; gen *CYP11B1*) y ésta en aldosterona (enzima 11-β-hidroxilasa de tipo 2, también 18-hidroxilasa y deshidrogenasa; gen *CYP11B2*). La 17-OH-P puede proseguir hacia la síntesis de glucocorticoides si es transformada en 11-desoxicortisol (enzima 21-hidroxilasa; gen *CYP21A2*) y éste en cortisol (enzima 11-β-hidroxilasa de tipo 1; gen *CYP11B1*).

La figura 1 también muestra la biosíntesis de esteroides sexuales (hasta testosterona y estradiol), aunque en las glándulas suprarrenales sólo se producen precursores: la DHEA a partir de la 17-OH-pregnenolona (enzima 17-20-desmolasa; gen *CYP17A1*) y la androstenediona a partir de la 17-OH-P (enzima 17-20-desmolasa; gen *CYP17A1*). A su vez, la DHEA puede transformarse en androstenediona (enzima 3-β-hidroxiesteroide-

deshidrogenasa de tipo 2; gen *HSD3B2*). Más allá de estos dos precursores, la androstenediona se transforma en testosterona (enzima 17-β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa de tipo 3; gen *HSD17B3*) a nivel del testículo y la DHEA en estrona (E1) (enzima aromata-sa; gen *CYP19A1*) a nivel del testículo y del ovario. A su vez, la T puede transformarse en estradiol (E2) (enzima aromata-sa; gen *CYP19A1*) y la E1 también en E2 (enzima 17-β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa de tipo 3; gen *HSD17B3*). En este esquema vemos también cómo la T es transformada en dihidrotestostero-na (DHT) (enzima 5-α-reductasa tipo 2; gen *SRD5A2*) más a nivel del metabolismo periférico.

Además de las enzimas citadas, son necesari-as algunas coenzimas también indicadas en la figura 1: las enzimas 21-hidroxilasa (P450C21

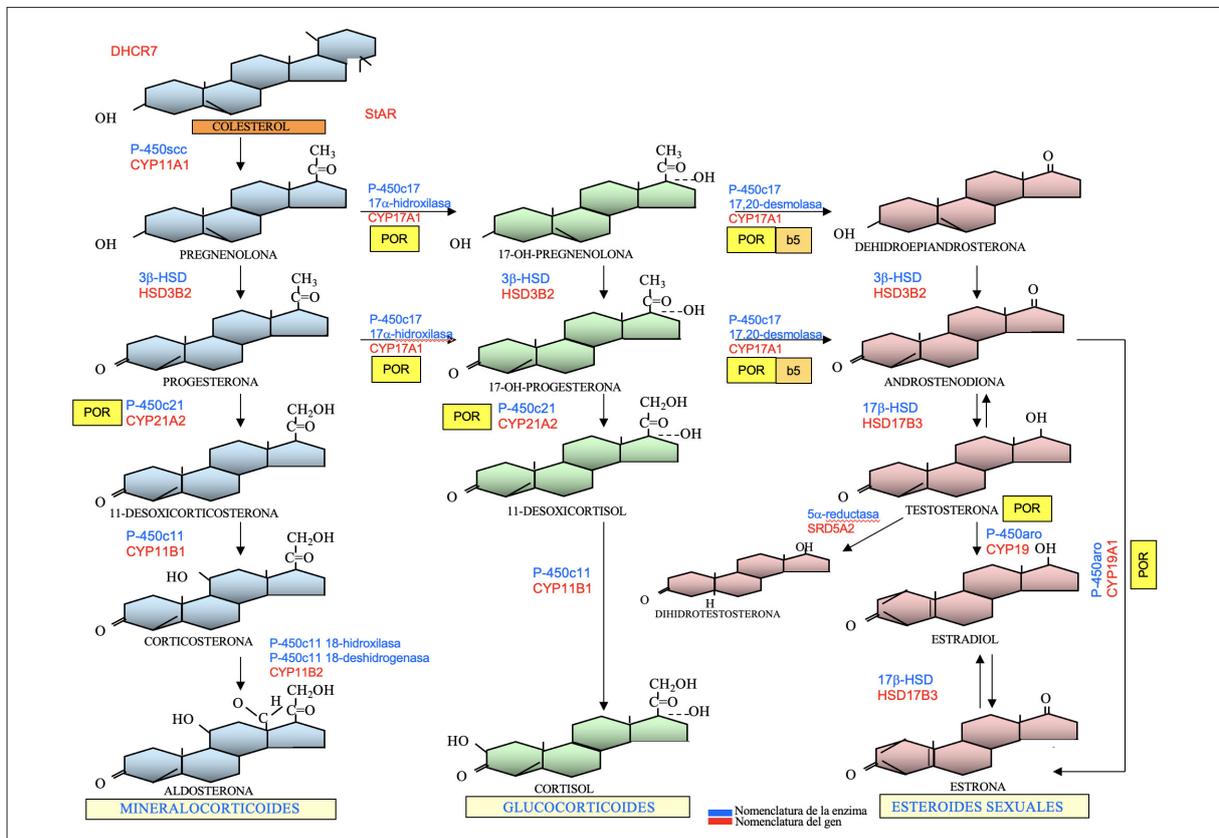


Figura 1. Esteroidogénesis suprarrenal y gonadal. Desde el colesterol, la biosíntesis progresa en la glándula suprarrenal hasta el cortisol (vía de los glucocorticoides) y hasta la aldosterona (vía de los mineralocorticoides). En las gónadas, los precursores progresan hacia los esteroides sexuales: testosterona (T) como principal andrógeno y estradiol como principal estrógeno. T se transforma periféricamente en DHT como andrógeno más potente. En azul: abreviación de las enzimas; en rojo: abreviación de los genes que codifican cada enzima; cuadro amarillo: coenzima POR (P450-oxidorreductasa); cuadro beige: citocromo b5. 3-β-HSD: 3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 2 (gen *HSD3B2*); 5-α-reductasa de tipo 2 (gen *SRD5A2*); 17-β-HSD: 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 3 o 17-cetorreductasa (gen *HSD17B3*); *DHCR7*: gen *DHCR7* (7-α-desidrocolesterol reductasa); P-450aro: aromata-sa (gen *CYP19A1*); P-450c11: 11β-hidroxilasa de tipo 1 (gen *CYP11B1*); P-450c11: 18-deshidrogenasa (corticosterona metil-oxidasa tipo II [CMO-II]) (gen *CYP11B2*); P-450c11: 18-hidroxilasa (corticosterona metil-oxidasa tipo I [CMO-I]) (gen *CYP11B1*); P-450c17: 17α-hidroxilasa/17,20-desmolasa o liasa (gen *CYP17A1*); P-450c21: 21-hidroxilasa (gen *CYP21A2*); P-450scc: P-450 side-chain cleavage: colesterol-desmolasa (gen *CYP11A1*); StAR: steroid acute regulatoryprotein (gen *StAR*).

ó CYP21A2), 17- α -hidroxilasa (P450C17 ó CYP17A1) y aromatasa (P450C19 ó CYP19A1) precisan como dador de electrones la proteína P-450-oxidoreductasa (POR; gen *POR*), y la 17,20-desmolasa (CYP17A1) precisa, además de POR, la presencia del citocromo b5 (CYB5; gen *CYB5A*).

Además de la esteroidogénesis suprarrenal y gonadal, representada en la figura 1, denominada vía clásica o 'delantera', existe otra vía también funcional, tanto en el feto como en la vida posnatal, denominada vía 'no clásica', 'alternativa' o 'trasera' (Figura 2). Esta vía es funcional ya en el feto y

sería necesaria para la virilización normal del feto masculino (biosíntesis de DHT sin pasar por la T) ⁽⁶⁾. La importancia de esta vía aumenta en algunos déficits enzimáticos, por aumento de precursores de la vía de la P y la 17-OH-P, de modo que el análisis de algunos de estos esteroides o de sus metabolitos urinarios alcanza una gran importancia tanto para algún diagnóstico como para explicar el origen de andrógenos virilizantes en algunos déficits enzimáticos, así como para controlar el seguimiento de algunos tratamientos.

Es funcional también una vía metabólica llamada de 'andrógenos 11-oxygenados' (a nivel del

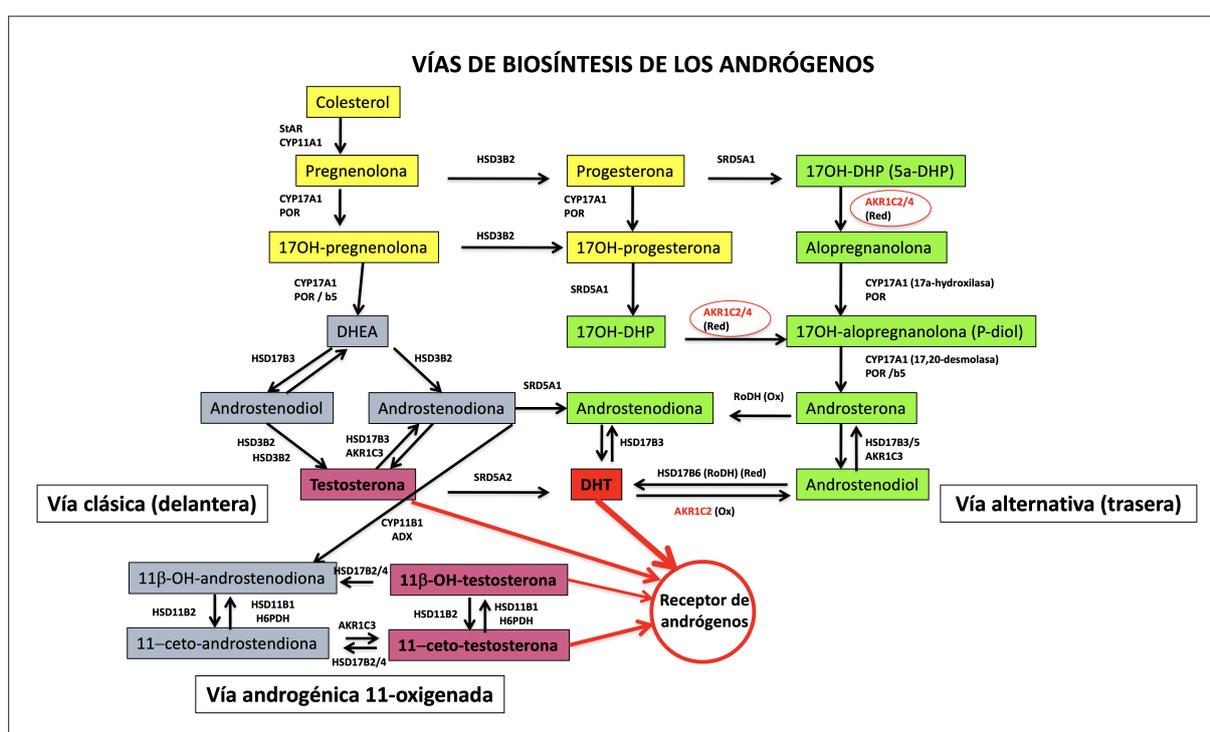


Figura 2. Vías de biosíntesis de andrógenos: vía clásica (o delantera), vía alternativa (no clásica o trasera) y vía de los andrógenos 11-oxygenados. La vía clásica progresa desde el colesterol hasta la testosterona (T), pasando por la pregnenolona (intervienen la proteína StAR [gen *STAR*] y la enzima colesterol desmolasa [gen *CYP11A1*]), la 17-OH-pregnenolona (enzima 17 α -hidroxilasa [gen *CYP17A1*] y coenzima P450-oxidoreductasa [gen *POR*]), la dehidroepiandrosterona (DHEA) (enzima 17,20-desmolasa [gen *CYP17A1*], coenzima P450-oxidoreductasa [gen *POR*] y citocromo b5 [gen *CYB5A*]), la androstenediona o el androstenediol (enzimas 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 2 [gen *HSD3B2*], 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 3 [gen *HSD17B3*] y aldocetorreductasa, familia 1, miembro C3 [gen *AKR1C3*]). La T se transforma en DHT mediante la enzima 5 α -reductasa de tipo 2 (gen *SRD5A2*). También la DHT puede proceder de la transformación de androstenediona en androstenediona (enzima 5 α -reductasa de tipo 1 [gen *SRD5A1*]) y de ésta en DHT (enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 3 [gen *HSD17B3*]).

La vía alternativa llega a la síntesis de DHT sin pasar por la T. En ella, la progesterona (procede de la pregnenolona) y la 17OH-progesterona (procede de la progesterona) se transforman en 17OH-DHP (5 α -dihidroxiprogesterona). Ésta llega a androsterona, la cual pasa a androstenediona o androstenediol, las cuales pasan a DHT (intervienen varias enzimas previamente descritas así, como aldocetorreductasa, familia 1, miembros C2 y C4 [genes *AKR1C2* y *AKR1C4*], retinol-deshidrogenasa [gen *RODH*], y 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 5 y de tipo 6 [genes *HSD17B5* y *HSD17B6*]).

La vía de los andrógenos 11-oxygenados transforma la androstenediona en 11- β -hidroxi-androstenediona (mediante CYP11B1 y adrenodoxina), ésta pasa, de forma reversible, a 11-cetoandrostenediona (HSD11B2 o HSD11B1 más H6PDH), ésta pasa a 11-cetotestosterona (AKR1C3 o HSD17B2/4) y ésta a 11- β -hidroxitestosterona (HSD11B1 más H6PDH o HSD11B2).

Ox: oxidación; Red: reducción.

carbono 11) en la cual, a partir de la androstenodiona, se sintetizan la 11-cetotestosterona y la 11- β -hidroxitestosterona, dos moléculas que tienen actividad androgénica, puesto que activan el receptor de andrógenos, aunque con menor afinidad que la DHT (Fig. 2). Esta vía aumenta cuando aumenta la síntesis de precursores como la androstenodiona en algunos déficits enzimáticos o en tumores suprarrenales ⁽⁶⁾.

Los esteroides circulan en la sangre ligados, en parte, a proteínas plasmáticas de forma no covalente: principalmente a la albúmina con una baja afinidad, aunque con gran capacidad; con mayor afinidad y especificidad, aunque menor capacidad, a la *corticosteroid binding globulin* (CBG), específica para el cortisol, la aldosterona y la progesterona, o a la *sex hormone binding globulin* (SHBG), específica para la T, la DHT y el E2. Deberá tenerse en cuenta este hecho para dilucidar si el laboratorio está midiendo en la sangre la totalidad de un determinado esteroide o sólo su fracción libre, puesto que es la fracción que circula libre en la sangre la que potencialmente puede tener actividad biológica. También se puede apreciar la fracción libre del cortisol o de la T midiendo sus niveles en la orina o en la saliva.

Además de los glucocorticoides, los mineralocorticoides y los esteroides sexuales y precursores descritos que circulan en la sangre periférica se metabolizan en diferentes tejidos (el hígado, el tejido adiposo, la piel y el folículo piloso, la próstata y, finalmente, también el riñón), de modo que se excretan en la orina numerosos metabolitos cuyo interés diagnóstico puede ser muy relevante ⁽⁷⁾.

3. Ontogenia de la esteroidogénia suprarrenal

Las glándulas suprarrenales derivan del surco urogenital del mesodermo medio, del que también derivan las gónadas y el mesonefros. El desarrollo de las células esteroidógenas comienza hacia la cuarta semana, y están claramente separadas de las gónadas hacia la quinta semana. Hacia la séptima semana se diferencia la médula suprarrenal a partir de células nerviosas simpáticas de la cresta neural que migran hacia el centro de las suprarrenales. A la octava semana, las glándulas suprarrenales están diferenciadas y la zona periférica o corteza suprarrenal presenta dos zonas, la fetal y la zona definitiva. La zona fetal ocupa aproximadamente el 80% del volumen de la glándula y es la zona más activa de la esteroidogénia. Debido a la baja actividad de la HSD3B2, produce mayoritariamente DHEA y, por la alta actividad de la sulfotransferasa, el sulfato de DHEA (DHEA-S) es el principal producto de la zona fetal. El DHEA-S es transformado en la placenta en estriol. La producción de cortisol es

detectable a las ocho semanas y tiene acciones importantes durante la vida intrauterina sobre la maduración de otros órganos, como el pulmón, el hígado, la tiroides y otros. También comienza la secreción de DOCA, corticosterona y aldosterona hacia las semanas 10-20.

La zona fetal comienza a involucionar después del nacimiento y desaparece hacia el final de primer año. La 'zona definitiva' de la suprarrenal (la periférica de la corteza) aumenta de tamaño y se diferencia a lo largo de los tres primeros años de vida en las tres zonas de la corteza suprarrenal adulta (glomerular, fascicular y reticular), aunque el desarrollo definitivo no es completo hasta poco antes del inicio de la pubertad.

En el recién nacido a término y de peso adecuado para la edad gestacional, el patrón de esteroides sintetizados por la suprarrenal sigue comportando la DHEA y el DHEA-S como cantidades superiores, seguidos del cortisol y de la aldosterona.

En el recién nacido no existe ritmo de secreción nictemeral, el cual se va estableciendo a lo largo de los primeros meses de vida. Los niveles de cortisol en la sangre pueden ser relativamente bajos y deben interpretarse junto con los de la ACTH. El ritmo nictemeral queda bien establecido hacia los 12 meses, en paralelo a una disminución del peso relativo de la glándula suprarrenal y una muy rápida disminución de los niveles sanguíneos de DHEA, de modo que se desarrollan más las zonas fascicular (principal síntesis de cortisol) y glomerular (principal síntesis de aldosterona) ^(8,9).

En el recién nacido prematuro y/o de bajo peso para la edad gestacional, los niveles sanguíneos de DHEA, 17-OH-P y androstenodiona suelen ser más elevados que en el recién nacido normal, el cortisol puede tardar más en alcanzar niveles normales y el ritmo nictemeral se establece más tarde.

A partir del año de edad, los niveles sanguíneos de cortisol y aldosterona y sus precursores, así como la ACTH hipofisaria, muestran un ritmo nictemeral con niveles máximos por la mañana y mínimos tras anochecer. Estos patrones ya no se modifican.

Pero existe un período de cambio en el patrón de la esteroidogénia suprarrenal, denominado adrenarquia (pubertad de la suprarrenal que ocurre antes de la pubertad gonadal), que afecta sólo a la secreción del precursor DHEA y al DHEA-S, y en menor medida de 17-OH-P y de androstenodiona. Este cambio se debe a una disminución de la actividad HSD3B2, cuya regulación no se ha

explicado todavía suficientemente. Este cambio en el patrón de secreción puede tener una repercusión clínica, ya sea porque se produzca de forma prematura o de forma 'exagerada' (adrenarquia precoz o exagerada) y, en todo caso, no tiene repercusión sobre la secreción de cortisol ni de ACTH ⁽¹⁰⁾.

El desarrollo de la pubertad gonadal ya no modifica el patrón de la esteroidogénesis suprarrenal.

Las causas de insuficiencia suprarrenal de origen primario por fallo en alguna de las etapas de su desarrollo y funcionalidad son de origen genético ⁽¹⁾.

Marcadores hormonales de la función suprarrenal en pediatría implementados en el laboratorio de diagnóstico

Hemos consultado a los miembros de la Comisión de Hormonas de la Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (https://www.seqc.es/es/comisiones/comision-de-hormonas/_id:12/) para conocer el estado actual de las determinaciones hormonales relacionadas con la función suprarrenal en los laboratorios de diagnóstico bioquímico de algunos hospitales públicos de España, y hemos obtenido respuesta de ocho centros, ubicados en Alicante (uno), Barcelona (tres), Madrid (dos), Terrassa (uno) y Vigo (uno). Exponemos a continuación los parámetros actualmente implementados, sus tecnologías y algunas pruebas funcionales diagnósticas.

1. Estudio de la secreción hipotalámica de CRH

La CRH es un péptido de 41 aminoácidos. Tiene una semivida de cuatro minutos; por ello, en las pruebas de estimulación se utiliza la CRH ovina, que, en humanos, presenta una semivida de 55 minutos. En la sangre periférica sus concentraciones son habitualmente indetectables (1-10 pg/mL), excepto durante el embarazo, en que aumentan hasta valores superiores a 2.500 pg/mL. Las concentraciones de CRH en la sangre periférica no se correlacionan con las concentraciones basales o estimuladas de cortisol o ACTH.

Tan sólo un laboratorio respondió haberlo determinado por radioinmunoensayo en el marco de un estudio.

2. Estudio de la secreción hipofisaria de hormona adrenocorticotropa

2.1 Determinación basal de la hormona adrenocorticotropa en el plasma

La forma predominante de ACTH circulante en la sangre contiene 39 aminoácidos, su semivida es

inferior a 20 minutos, y su secreción muestra un ritmo ultradiano y circadiano, con una secreción máxima durante las primeras horas de la mañana y mínima durante las primeras horas de la noche.

Sin embargo, en algunos casos de enfermedad de Cushing por adenomas productores de ACTH, existen formas de ACTH de pesos moleculares superiores, circulantes en la sangre periférica, que no son detectadas por los anticuerpos monoclonales, lo que da lugar a concentraciones falsamente normales. Por ello, algunos autores recomiendan todavía la utilización de radioinmunoensayos policlonales para detectar formas anómalas de ACTH en tumores adenohipofisarios.

El ritmo circadiano presenta concentraciones máximas a primera hora de la mañana (7:00-9:00 horas) (20-80 pg/mL), que disminuyen progresivamente a lo largo del día hasta <20 pg/mL hacia las 16:00 horas y alcanzan un nivel mínimo una hora después del inicio del sueño (<5 pg/mL). La determinación de concentraciones plasmáticas de ACTH deberá, por lo tanto, tener en cuenta la hora de la extracción de la sangre.

Las condiciones de obtención de la muestra de sangre son muy importantes en el caso de la ACTH, ya que es un péptido que se degrada fácilmente por las enzimas de las células sanguíneas y de las plaquetas. Es necesario extraer la sangre en tubos prerrefrigerados que contengan ácido etilendiaminotetraacético como anticoagulante, mantenerlos en hielo, centrifugarlos inmediatamente en una centrífuga refrigerada, separar el plasma y congelarlo lo antes posible.

El estrés es un estímulo de la secreción de ACTH que deberá tenerse en cuenta al valorar las muestras obtenidas inmediatamente tras la venopunción.

Para la correcta interpretación de las concentraciones plasmáticas de ACTH es imprescindible realizar una determinación simultánea de cortisol como índice de secreción suprarrenal del principal glucocorticoide.

En una situación clínica de estrés, deshidratación y/o hipoglucemia, la determinación basal de la ACTH y el cortisol informa sobre el estado funcional del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal, puesto que éste debería estar activado, y se observan concentraciones aumentadas tanto de ACTH como de cortisol si no existe ninguna insuficiencia, ni hipotalámico-hipofisaria ni suprarrenal primaria.

Actualmente todos los laboratorios consultados lo determinan en el plasma obtenido con ácido

etilendiaminotetraacético, mediante algún inmunoensayo monoclonal quimioluminiscente automatizado, y es importante la obtención rápida de resultados.

2.2. Determinación de la hormona adrenocorticotropa en los senos petrosos

En el diagnóstico de la enfermedad de Cushing por microadenomas productores de ACTH, la determinación del origen pituitario frente a ectópico y la localización del microadenoma (lado derecho frente a izquierdo) pueden requerir el cateterismo de los senos petrosos inferiores para la extracción de micromuestras de sangre de ambos lados y, simultáneamente, también de una vena periférica para determinar las concentraciones de ACTH. El hallazgo de un gradiente senos petrosos/vena periférica superior a 2,5 indica que el origen de la producción de ACTH es hipofisario. La medición de ACTH a los 3, 5 y 10 minutos del estímulo con CRH aumenta la eficacia diagnóstica de esta prueba para determinar el origen pituitario o ectópico de la secreción de ACTH (sensibilidad del 97%, especificidad del 100%); también la estimulación con desmopresina se ha utilizado para confirmar el gradiente centro-periférico, aunque es poco sensible para localizar el tumor⁽¹¹⁾. El problema fundamental de esta prueba es la dificultad técnica del cateterismo de los senos petrosos, que solamente se realiza en centros experimentados.

Ninguno de los laboratorios consultados recuerda haber recibido este tipo de muestras procedentes de pediatría, pero sí de adultos, aunque la bibliografía refiere su eficacia mediante estimulación con desmopresina en pediatría⁽¹¹⁾.

2.3. Estimulación de la secreción de hormona adrenocorticotropa

Debido a su secreción pulsátil y a su corta semivida, en numerosas situaciones clínicas, una determinación basal aislada de la ACTH en el plasma no permite conocer la capacidad secretoria de la adenohipófisis ante situaciones en las que fisiológicamente aumenta la demanda. Para ello, es necesario estimular la secreción hipofisaria de ACTH mediante la administración de sustancias que provoquen un aumento de esa secreción. Entre ellas, la más natural y fisiológica es el péptido hipotalámico CRH, el estimulador natural de la síntesis y secreción de ACTH. Antes de la caracterización y obtención de la CRH, se utilizaban estímulos indirectos como los provocados por la administración de metopirona o de insulina. Estos estímulos se utilizan poco en la clínica habitual de pediatría, excepto cuando se realiza una hipoglucemia insulínica con el objetivo de estimu-

lar otras hormonas hipofisarias, como la hormona de crecimiento.

Test de CRH. La CRH sintética (ovina o humana) se administra en bolos endovenosos de 100 µg (o 1 µg/kg de peso corporal) con el paciente en reposo previo de 30 minutos. Se determina la respuesta de la ACTH en muestras sanguíneas obtenidas inmediatamente antes y a los 15, 30, 45, 60 y 90 minutos, y se produce una respuesta máxima alrededor de los 30 minutos. En individuos normales, las concentraciones de ACTH en respuesta a la CRH se duplican respecto al valor basal. Es recomendable cuantificar el cortisol plasmático para valorar la respuesta final al estímulo. La respuesta máxima del cortisol se obtiene algo más tarde, entre los 30 y los 45 minutos, y debe incrementarse al menos un 20% respecto al valor basal.

La falta de respuesta de la ACTH a la estimulación con CRH indica una insuficiencia primaria hipofisaria o una insuficiencia funcional por supresión provocada por un exceso de glucocorticoides de origen endógeno o exógeno. Los pacientes con déficit suprarrenal terciario (déficit de CRH hipotalámica) presentan una respuesta exagerada y prolongada de ACTH junto con niveles subnormales de cortisol.

En el síndrome de Cushing, se obtiene una respuesta exagerada de la ACTH (incremento superior al 35% del valor basal) y del cortisol cuando se trata de la enfermedad de Cushing, mientras que no hay respuesta cuando el origen del síndrome es suprarrenal o ectópico.

Test de metopirona. La metopirona inhibe la enzima 11-β-hidroxilasa (CYP11B1), bloqueando la síntesis de cortisol. La disminución del cortisol plasmático estimula la liberación de CRH y ACTH, lo que provoca un aumento de los precursores inmediatos, principalmente del 11-desoxicortisol. Esta prueba (administración de una dosis única nocturna de 750 mg de metopirona) se realiza obteniendo una muestra de sangre basal y otra el día posterior para determinar el cortisol, el 11-desoxicortisol y la ACTH. Se considera válida la prueba cuando el cortisol del día posterior es inferior a 8 µg/dL, lo que indica un bloqueo adecuado de la actividad 11-β-hidroxilasa. En individuos normales, la administración de metopirona produce un incremento de la concentración de ACTH (>75 pg/mL) y del 11-desoxicortisol (>7 µg/dL). Esta prueba se sigue utilizando en el diagnóstico de la insuficiencia suprarrenal secundaria (no hay elevación del 11-desoxicortisol ni de la ACTH), aunque su principal indicación en la actualidad es el diagnóstico etiológico del síndrome de Cushing, al obtenerse hiperrespuesta en la

enfermedad de Cushing y falta de respuesta en el síndrome de Cushing por tumor suprarrenal o de origen ectópico.

De todas formas, sólo uno de los laboratorios consultados había realizado un test de metopirona en una sola ocasión en un adulto.

Test de hipoglucemia insulínica. La hipoglucemia inducida por insulina es una de las pruebas más sensibles para valorar la integridad del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal y evaluar su capacidad de respuesta ante situaciones de estrés. La hipoglucemia es un estímulo cuya magnitud es cuantificable, que provoca un aumento de la secreción de CRH, de ACTH y de cortisol proporcional a su intensidad. En la actualidad, la principal indicación de esta prueba es la valoración simultánea de la reserva de ACTH y de hormona de crecimiento en pacientes con sospecha de hipopituitarismo. En el protocolo más utilizado habitualmente, la prueba se inicia a primera hora de la mañana, con el paciente en decúbito supino y en ayunas desde la noche anterior. Se cateteriza una vena periférica y, al cabo de 30 minutos, se inyectan 0,15 UI/kg de insulina rápida (0,10 UI/kg en niños) por vía intravenosa, y se extrae sangre inmediatamente antes, y a los 15, 30, 45, 60 y 90 minutos para la determinación de la glucosa, el cortisol (opcionalmente, la ACTH) y la hormona de crecimiento. Para que la prueba sea válida, es necesario que la concentración de glucosa descienda por debajo de 40 mg/dL y se acompañe de síntomas de hipoglucemia (taquicardia, sudor, sensación de hambre). La hipoglucemia máxima suele producirse alrededor de los 30 minutos, mientras que la respuesta máxima del cortisol se observa entre los 60 y los 90 minutos, y la de la ACTH, entre los 30 y los 45 minutos. Una respuesta del cortisol superior a 18 µg/dL confirma la integridad del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal. La dosis de insulina debe ajustarse en función del estado clínico del paciente y de la sospecha diagnóstica: 0,1 UI/kg ante la sospecha de insuficiencia suprarrenal y hasta 0,3 UI/kg en pacientes con resistencia a la insulina (obesidad, diabetes mellitus, acromegalia o síndrome de Cushing). Esta prueba tiene que realizarse siempre bajo la supervisión de un médico, que debe determinar si está indicada. Existen contraindicaciones formales, como la existencia de antecedentes de crisis epilépticas, alteraciones mentales y cardiopatía isquémica. No está indicado realizarla en pacientes con un cortisol basal a las 8:00 horas inferior a 5 µg/dL.

Esta prueba ya casi no se utiliza en pediatría por sus posibles efectos vitales graves.

2.4. Supresión de la secreción de hormona adrenocorticotropa

Pruebas de supresión con dexametasona. En el diagnóstico del hipercortisolismo ocupan un lugar destacado las pruebas de inhibición con dexametasona, glucocorticoide sintético muy potente, con una semivida larga y que no interfiere desde el punto de vista analítico en la determinación del cortisol. Existen diferentes pruebas de inhibición cuyos protocolos podemos agrupar en función de la dosis de dexametasona que utilizan:

- Pruebas que utilizan dosis bajas de dexametasona (pruebas de supresión rápida y supresión débil). Estas pruebas se basan en que en los individuos en los que los mecanismos de retroalimentación negativa están intactos, la administración de pequeñas dosis de glucocorticoide exógeno inhibe la secreción de la ACTH hipofisaria y, por tanto, la de cortisol, mientras que los pacientes con síndrome de Cushing de cualquier etiología pierden de manera característica esta capacidad de supresión. En la prueba rápida, la administración de 1 mg de dexametasona a las 23:00 horas produce una inhibición máxima del cortisol y de la ACTH a las 8:00 horas del día siguiente (cortisol < 5 µg/dL y ACTH < 5 pg/mL), mientras que, en la mayoría de los pacientes con síndrome de Cushing, es superior a 10 µg/dL. La máxima sensibilidad diagnóstica para descartar un síndrome de Cushing se obtiene tomando 1,8 µg/dL como punto de corte para el cortisol en el suero del día posterior. Esta prueba presenta un 10-15% de falsos positivos, debidos fundamentalmente a la aceleración del metabolismo de la dexametasona en pacientes tratados con inductores enzimáticos o con estrógenos, o a la presencia de enfermedades agudas graves. La máxima sensibilidad diagnóstica se obtiene cuando se toma una concentración inferior a 1,8 µg/dL como punto de corte para el cortisol en el suero del tercer día, y una excreción de cortisol libre urinario durante el segundo día inferior a 10 µg/24 horas. Esta prueba presenta la misma sensibilidad que la obtenida con dosis única, pero es mucho más específica.
- Pruebas que utilizan dosis altas de dexametasona: son pruebas destinadas a determinar la etiología en pacientes que han sido diagnosticados de síndrome de Cushing. Se basan en que los pacientes con enfermedad de Cushing de origen hipofisario mantienen la capacidad de inhibición de la secreción de ACTH por glucocorticoides exógenos, cuando éstos se administran en dosis elevadas,

mientras que los pacientes con síndrome de Cushing causado por tumor suprarrenal o por ACTH de origen ectópico se muestran resistentes, a pesar de aumentar la dosis de dexametasona. En el protocolo de dosis múltiple, se administran 2 mg/6 horas de dexametasona por vía oral durante dos días; se valora el cortisol libre en muestras de orina de 24 horas recogidas el día previo y durante el segundo día, y el cortisol y la ACTH plasmáticos a las 8:00 horas del tercer día. Los pacientes con enfermedad de Cushing muestran un descenso significativo del cortisol. El 70% presenta una disminución de su excreción urinaria superior al 90%, mientras que, en el 78%, el cortisol plasmático desciende en más del 50%. Existen respuestas falsamente positivas en pacientes con secreción ectópica de ACTH, en especial las asociadas a carcinoma bronquial. En el protocolo con administración de una dosis única nocturna (8 mg), únicamente se valora el cortisol plasmático a las 8:00 horas del día siguiente.

Prueba combinada con dexametasona y CRH.

La prueba de supresión con dosis baja de dexametasona (0,5 mg/6 h durante 2 días) seguida (2 h después de la última dosis) de una estimulación con CRH (1 µg/kg) a las 8 horas de la mañana se ha mostrado útil para diferenciar el síndrome de Cushing del pseudo-Cushing en varias situaciones como la obesidad, el alcoholismo, la anorexia nerviosa, etc. El cortisol a los 15 minutos de la CRH se mantiene inhibido en el pseudo-Cushing, mientras que en el síndrome de Cushing aumenta por encima de 1,4 o de 2 µg/dL.

3. Estudio de la secreción suprarrenal de glucocorticoides

3.1. Determinación basal del cortisol en el suero y ritmo nictemeral

El cortisol es el principal glucocorticoide secretado por la corteza suprarrenal. Su secreción es de tipo pulsátil, con un marcado ritmo circadiano, paralelo al de la ACTH, con concentraciones máximas a primeras horas de la mañana (10-20 µg/dL o 275-555 nmol/L), intermedias a las 16:00 horas (3-10 µg/dL o 85-275 nmol/L) y mínimas una hora después del inicio del sueño (< 5 µg/dL o <140 nmol/L). A pesar de presentar secreción pulsátil y ritmo circadiano, el hallazgo de un cortisol a las 8:00 horas inferior a 4 µg/dL es altamente predictivo de insuficiencia suprarrenal, mientras que concentraciones basales superiores a 17 µg/dL prácticamente la descartan. La determinación de la concentración de cortisol a las 8:00 horas y a las 24:00 horas es útil para demostrar la pérdida del ritmo nictemeral, que es una característica

constante del síndrome de Cushing. Es importante realizar la prueba con el paciente hospitalizado en el segundo día del ingreso. El hallazgo de una concentración de cortisol a las 24 horas inferior a 1,8 µg/dL prácticamente descarta el síndrome de Cushing.

Todos los laboratorios consultados determinan actualmente el cortisol sérico mediante alguna técnica de inmunoensayo quimioluminiscente automatizado, y es muy importante la rapidez de obtención de los resultados. Estas técnicas miden el cortisol total. Sólo un laboratorio ha referido analizar el cortisol por cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas (LC-MS-MS) en muestras seleccionadas que presentan resultados elevados debido a posibles interferencias provocadas por esteroides exógenos o endógenos.

3.2. Determinación del cortisol en la saliva

El cortisol y algunos precursores, como la 17-OH-P, se excretan por la saliva, y sus concentraciones aquí son algo superiores a la fracción libre de cortisol circulante en la sangre periférica. Existe una correlación significativa entre los cambios detectados en las concentraciones de cortisol en el suero y en la saliva con independencia del flujo salival, y se observa el mismo ritmo circadiano y la misma respuesta a los test de estimulación y de supresión, por lo que se ha propuesto esta determinación para valorar el cortisol biológicamente activo, obviando la extracción de sangre. Pueden utilizarse las mismas técnicas de inmunoensayo que para el cortisol en el suero, a condición de que presenten la suficiente sensibilidad. Las concentraciones de cortisol en la saliva en voluntarios sanos son de $5,5 \pm 0,3$ ng/mL a las 8:00 horas y de $1,4 \pm 0,1$ ng/mL a las 22:00 horas, y se observan valores inferiores en las mujeres que en los hombres. El hallazgo de concentraciones de cortisol > 1,3 ng/mL en muestras de saliva obtenidas a las 23:00 horas permite diagnosticar el síndrome de Cushing con una sensibilidad del 92%.

Cinco de ocho laboratorios utilizan una técnica de inmunoensayo quimioluminiscente y tres de ocho un análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), todos automatizados y adaptados a la sensibilidad requerida. Existen procedimientos para la obtención de la muestra de saliva adaptados a edades pediátricas.

3.3. Determinación de la excreción urinaria de cortisol libre

La degradación del cortisol se produce principalmente en el hígado mediante diversos procesos

enzimáticos de oxidación, reducción, hidroxilación y conjugación que lo transforman en metabolitos hidrosolubles que son excretados por la orina. Se ha demostrado que la secreción diaria se sitúa alrededor de 10 mg/día (5,7-6,8 mg/m²/día en niños adolescentes y adultos normales).

Una pequeña fracción del cortisol libre es filtrada por el riñón sin haber sido metabolizada y se excreta por la orina como molécula intacta. Esta fracción, que corresponde aproximadamente al 1% del cortisol total secretado, se denomina cortisol libre urinario, que puede medirse en la orina de 24 horas como índice de secreción diaria. Constituye un parámetro muy útil en la clínica, por ser el índice que mejor refleja la producción diaria de cortisol en presencia de una función renal conservada. Su determinación es imprescindible en el estudio de los estados de hipercortisolismo. Tiene una gran sensibilidad en el diagnóstico del síndrome de Cushing, por lo que es muy útil como prueba de cribado. Sin embargo, la especificidad es menor, ya que existe un aumento de la excreción urinaria de cortisol en los síndromes de pseudo-Cushing. En casos de insuficiencia suprarrenal tiene poco interés, ya que los valores se solapan con los valores bajos hallados en individuos normales.

Para su determinación, los laboratorios consultados utilizan las mismas técnicas de inmunoensayo automatizado que para el cortisol sérico, con una fase de extracción previa con diclorometano para obviar posibles interferencias. El cortisol en la orina también puede medirse por LC-MS-MS, que constituye el método más específico, ya que no presenta interferencias por esteroides exógenos. Uno de los laboratorios aplica esta técnica en las muestras en las que se han detectado valores elevados por inmunoensayo.

El límite superior del intervalo de referencia del cortisol libre en la orina de 24 horas varía en función de la especificidad del método empleado para su cuantificación: inferior a 50 µg/24 horas cuando se usa LC-MS-MS e inferior a 100 µg/24 horas para los inmunoanálisis.

La evolución de las concentraciones urinarias de cortisol libre durante 24 horas en función de la edad puede observarse en Audí y Granada ^(12,13).

Es recomendable hacer determinaciones de cortisol en la orina de dos o tres días consecutivos para minimizar los errores inherentes a la recogida de la muestra, así como determinar simultáneamente la creatinina urinaria, para comprobar que la recogida de la orina de 24 horas ha sido adecuada. La excreción urinaria de cortisol por metro cuadrado de superficie corporal permanece

constante a lo largo de la vida, por lo que no es preciso utilizar entonces valores de referencia específicos para la edad durante la infancia (conviene entonces multiplicar por la superficie corporal del niño y dividir por 1,72) o en individuos obesos.

3.4. Determinación de cortisol en el cabello

Esta determinación se ha propuesto para el diagnóstico del síndrome de Cushing llamado 'ciclíco'. Cada centímetro de cabello podría informar sobre el cortisol promedio mensual ⁽¹⁴⁾. Sólo uno de los laboratorios consultados implementa esta técnica.

3.5. Determinación de la proteína de transporte CBG

El 97% del cortisol circula en la sangre periférica unido a proteínas plasmáticas. Entre ellas, la principal es la CBG o transcortina, que une el 75% del cortisol y el 20% de la aldosterona con una afinidad y una especificidad elevadas. En condiciones fisiológicas, la CBG se satura en concentraciones plasmáticas de cortisol de 25 µg/dL, por lo que, cuando se sobrepasa este nivel, aumenta de manera brusca la fracción libre. Hay una serie de circunstancias fisiológicas y patológicas que cursan con alteraciones de la CBG, lo que provocará cambios concomitantes en las concentraciones de cortisol total con el fin de mantener la fracción libre adecuada para la actividad biológica. Por su afinidad y especificidad elevadas, los cambios en la producción, principalmente hepática, de la CBG, o en sus características moleculares (disminución de afinidad) pueden provocar cambios en las fracciones circulantes de cortisol. Se trata de patologías raras, pero que es necesario conocer (OMIM 611489).

Existen radioinmunoanálisis para la determinación de las concentraciones séricas de CBG, aunque no han llegado a comercializarse por su aplicabilidad muy restringida a patologías de escasa frecuencia o a estudios muy delimitados. Las concentraciones plasmáticas de CBG son, en el adulto, de 700 nmol/L (35-40 ng/L). Las concentraciones son algo más altas en los niños prepuberales y algo más bajas en los ancianos. No presentan ritmo circadiano ni diferencias entre sexos ni dentro del ciclo menstrual; sólo aumentan bajo la administración de estrógenos y durante el tercer trimestre del embarazo. También están aumentadas en la hepatitis crónica, algunas leucemias agudas y de forma congénita. Por el contrario, las concentraciones de CBG se hallan disminuidas en patologías con pérdida importante de proteínas (síndrome nefrótico o enteropatías), shock séptico, diabetes mellitus, hipertiroidismo,

en algunos casos de síndrome de Cushing, en la obesidad o de forma congénita.

3.6. Estimulación de la secreción suprarrenal de cortisol

El estudio de las concentraciones basales de cortisol en el suero o en la saliva, el estudio del ritmo circadiano y el de la excreción urinaria no son suficientes para estudiar la capacidad de respuesta de la corteza suprarrenal ante una situación de demanda de aumento de secreción.

Ya se ha mencionado en el apartado dedicado a la ACTH que los test de estimulación de la secreción del péptido hipofisario también estimulan, en caso de ser normal la secreción de la ACTH, la secreción de cortisol. Por ello, también se cuantifica el cortisol sérico en las muestras de sangre procedentes de los test de CRH, de hipoglucemia insulínica, etc.

Estimulación aguda con ACTH sintética. La estimulación directa de la corteza suprarrenal con ACTH exógena es una prueba rápida y segura para diagnosticar la insuficiencia suprarrenal instaurada. Utiliza la ACTH sintética (tetracosactida) con la misma secuencia 1-24 de la molécula endógena de 39 aminoácidos, que es la que posee actividad biológica. La semivida de esta ACTH inyectada por vía endovenosa es de 20 minutos y provoca un aumento del cortisol circulante que es máximo entre los 30 y los 60 minutos después de la administración e independiente de la hora del día. La administración por vía subcutánea o intramuscular también induce un aumento del cortisol con las mismas características y se ha utilizado en pediatría. La dosis de tetracosactida clásicamente utilizada es de 0,25 mg en adultos y de 0,125 mg en niños menores de 2 años. Se realiza una extracción de sangre basal (inmediatamente antes) y a los 30 ó 60 minutos para la determinación de cortisol. Numerosos trabajos equiparan la sensibilidad diagnóstica de la concentración de cortisol en muestras sanguíneas obtenidas a los 30 y los 60 minutos, por lo que, en el marco de las pruebas funcionales ambulatorias, se prefiere la extracción a los 30 minutos con el fin de terminar antes la prueba. Se considera normal una respuesta máxima de cortisol superior a 20 µg/dL. Es conveniente realizar una determinación de la ACTH en la muestra de plasma basal. La presencia de una respuesta subnormal del cortisol junto con concentraciones elevadas de ACTH es diagnóstica de insuficiencia suprarrenal primaria, mientras que, en la insuficiencia suprarrenal secundaria o yatrógena, la concentración de ACTH es baja.

Diversos autores han propuesto realizar la estimulación suprarrenal utilizando dosis bajas de te-

tetracosactida (1 µg o 0,5 µg/1,73 m² de superficie corporal), ya que inducen la misma respuesta de cortisol y permiten detectar casos de insuficiencia suprarrenal parcial, que quedarían enmascarados al utilizar la dosis estándar de 0,25 mg. Una respuesta del cortisol a 1 µg de tetracosactida superior a 21,7 µg/dL indica que el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal está intacto.

La respuesta del cortisol a la estimulación aguda con ACTH en los dos sexos, en función de la edad, puede observarse en Audí y Granada ^(12,13).

Esta prueba se realiza en todos los centros consultados, teniendo en cuenta que la dosis de 0,25 mg sólo se utiliza cuando el peso es superior a 30 kg y la estimulación con 1 µg no se utiliza en pediatría.

Estimulación crónica con ACTH. En la insuficiencia suprarrenal secundaria, el déficit crónico de ACTH endógena produce una atrofia de la corteza suprarrenal que se traduce en la falta de respuesta del cortisol al estímulo agudo con ACTH. La administración crónica de ACTH sintética puede restablecer la capacidad de secreción de cortisol en la insuficiencia suprarrenal secundaria, pero no en la insuficiencia primaria.

Se administra un preparado *depot* de tetracosactida por vía intramuscular durante cuatro días consecutivos, y se obtienen muestras de sangre basal y al tercer y quinto días del inicio de la prueba para la determinación del cortisol. El aumento progresivo de las concentraciones de cortisol indica insuficiencia suprarrenal secundaria.

3.7. Supresión de la secreción suprarrenal de cortisol

La exploración de los estados de hipercorticismismo requiere el estudio diferencial de la supresión de la secreción tanto hipofisaria como suprarrenal por el glucocorticoide sintético dexametasona. Ya se han mencionado en el apartado dedicado a la supresión de la secreción de la ACTH los diversos protocolos de administración de la dexametasona. La supresión de la secreción de cortisol puede medirse en la sangre periférica, normalmente en una extracción a primera hora de la mañana. En esta muestra se determinan el cortisol y la ACTH. En las pruebas de administración de dexametasona durante 2 días, como mínimo, es también muy útil realizar una recogida de orina durante las últimas 24 horas de la prueba para la determinación del cortisol libre urinario. Uno de los laboratorios consultados refiere que en pediatría sólo realizan supresión con 2 mg de dexametasona.

3.8. Cateterismo de las venas suprarrenales

El estudio de tumores suprarrenales de difícil localización por técnicas de imagen obligó, en algunos casos, a la determinación, mediante cateterismo selectivo de sendas venas suprarrenales, de las concentraciones de cortisol y precursores o de aldosterona ante un síndrome de Conn. Ello permite localizar el origen de la hiperproducción de esteroides suprarrenales. Sin embargo, se trata de una técnica delicada, por lo que su utilización se ha restringida mucho y además actualmente las técnicas de imagen permiten una mejor localización de los tumores suprarrenales.

Sólo cinco de los ocho laboratorios consultados habían recibido muestras procedentes de adultos y ninguna de pediatría.

3.9. Determinación de cortisona en el suero o en la orina

La cortisona es el metabolito del cortisol tras la acción de la 11- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 2 (HSD11B2), que lo inactiva. Su medición en el suero o en la orina es importante para el cálculo del cociente cortisol/cortisona como índice de la actividad enzimática. Así, permite el diagnóstico diferencial del exceso aparente de mineralocorticoides (disminución de la inactivación del cortisol y aumento de la activación del receptor de mineralocorticoides por el cortisol) ⁽¹⁵⁾.

Sólo un laboratorio implementa esta determinación mediante LC-MS-MS, mientras que otro refiere poder externalizar esta determinación.

4. Estudio de la secreción suprarrenal de esteroides precursores del cortisol

La figura 1 muestra la cadena de esteroides y las enzimas que, desde el colesterol, llevan a la biosíntesis del principal glucocorticoide, el cortisol, y del principal mineralocorticoide, la aldosterona. Todos los esteroides precursores del cortisol se excretan también a la sangre periférica y circulan por ella. En principio, no se atribuye ninguna actividad biológica a estos productos, aunque se intenta atribuir una función fisiológica a la DHEA, pero su cuantificación puede ser imprescindible en el marco del estudio diagnóstico de las deficiencias enzimáticas de la esteroidogénesis suprarrenal, tanto en sus formas congénitas por mutaciones en los correspondientes genes como en las formas funcionales adquiridas. Por otra parte, su estudio durante la infancia y la pubertad ha permitido conocer la ontogenia del patrón de secreción suprarrenal, que presenta diversas etapas bien diferenciadas que no afectan cuantitativamente a la secreción de cortisol ^(12,13).

Todos estos precursores (excepto el DHEA-S) presentan un ritmo de secreción circadiano que deberá tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados.

4.1. Determinación basal de precursores

11-desoxicortisol. Se trata del precursor inmediato del cortisol (Figura 1). Su producción es exclusiva de la corteza suprarrenal. Su determinación debe realizarse en el marco del anteriormente mencionado test de metopirona que inhibe la actividad de la 11- β -hidroxilasa, ya que indicará la eficacia de dicha metopirona y la respuesta de la suprarrenal al consiguiente aumento de secreción de ACTH.

Su determinación también es diagnóstica del déficit congénito de 11- β -hidroxilasa (gen *CYP11B1*) como causa de hiperplasia suprarrenal congénita. Las concentraciones basales son muy elevadas en las formas clásicas o graves del déficit. Dada la escasa frecuencia de las mutaciones del gen *CYP11B1* en nuestra población y la elevada frecuencia del déficit de 21-hidroxilasa (gen *CYP21A2*), el diagnóstico diferencial sólo debe establecerse entre ambas deficiencias ante una clínica de forma clásica de hiperplasia suprarrenal congénita, sin pérdida de sal, en la que, además de la 17-OH-progesterona elevada, también lo esté el 11-desoxicortisol.

Las formas no clásicas del déficit sólo pueden diagnosticarse tras la estimulación con ACTH.

Las concentraciones basales de 11-desoxicortisol y su respuesta a la estimulación con ACTH, en los dos sexos, en función de la edad, se muestran en Audí y Granada ^(12,13).

No existen actualmente técnicas de inmunoensayo automatizado comercializadas para su cuantificación. Sólo existe un radioinmunoensayo. Su cuantificación óptima es por LC-MS-MS ⁽¹⁵⁾.

Entre los laboratorios consultados, dos de ellos pueden derivar estas muestras a un laboratorio externo y están en proceso de implementar una técnica de LC-MS-MS.

17-OH-P. Se trata del precursor inmediato del 11-desoxicortisol (Figura 1). Su cuantificación es diagnóstica para el déficit enzimático suprarrenal más frecuente, el de 21-hidroxilasa.

Las concentraciones basales están muy elevadas en las formas clásicas del déficit, tanto con pérdida de sal como virilizante simple, aunque las concentraciones guardan una correlación con la intensidad de la deficiencia.

El diagnóstico de las formas no clásicas requiere la estimulación suprarrenal con ACTH.

La 17-OH-P no sólo se origina en la corteza suprarrenal, sino que también se excreta por las gónadas (tanto el ovario como el testículo, a partir de la pubertad). Las concentraciones basales presentan una evolución ontógena^(12,13) desde el nacimiento hasta la edad adulta. Antes de la pubertad, su origen es exclusivamente suprarrenal y puede observarse que las concentraciones del recién nacido son elevadas, pero disminuyen rápidamente a lo largo de las primeras semanas de vida, vuelven a aumentar algo en el sexo masculino debido al período de actividad testicular de los cuatro primeros meses de vida, y después se mantienen concentraciones muy bajas y similares en ambos sexos durante la infancia, hasta que comienzan a aumentar algo en el momento de la adrenarquia, para aumentar más significativamente a lo largo de los estadios de la pubertad. En el adulto, las concentraciones del sexo masculino son superiores a las de la mujer en la fase folicular del ciclo ovárico, pero son superiores en ésta durante la fase luteínica.

Las técnicas de cuantificación actuales son inmunoensayos específicos y sensibles que pueden ser de tipo radioinmunoensayo, quimioluminiscencia o ELISA automatizados, y la técnica más específica sin interferencias es la LC-MS-MS⁽¹⁵⁾. Es también posible la cuantificación en la saliva y en muestras de papel de filtro impregnado de sangre para el diagnóstico precoz del déficit de 21-hidroxilasa. Uno de los laboratorios tiene previsto, en breve, pasar su cuantificación a LC-MS-MS.

Androstenodiona. Es el precursor de la testosterona en la cadena de esteroidogénesis que lleva a la biosíntesis de la testosterona (predominante en el testículo) y el precursor de la estrona en la cadena de esteroidogénesis que lleva a la biosíntesis de estrógenos (predominante, aunque no exclusiva, en el ovario) (Figura 1).

La ontogénesis de las concentraciones basales en la sangre periférica presenta un patrón similar al de la 17-OH-P^(12,13).

Sus concentraciones están aumentadas en la hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa y de 11- β -hidroxilasa, pero no son el principal parámetro diagnóstico.

Su cuantificación en la sangre periférica es interesante como marcador de buen control bajo tratamiento sustitutivo con hidrocortisona del déficit de 21-hidroxilasa, y se recomienda mantener concentraciones normales para la edad (la

17-OH-P no constituye un buen parámetro para el control del tratamiento, porque, en las formas clásicas graves, la normalización de las concentraciones basales indica un exceso de tratamiento sustitutivo).

Sus concentraciones están aumentadas en el hiperandrogenismo de origen ovárico.

Es el parámetro diagnóstico en el déficit enzimático de 17- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa de tipo 3 o 17-cetorreductasa (gen *HSD17B3*) que afecta a las gónadas, aunque los niveles basales están ya aumentados, pero aumentan todavía más bajo estimulación con ACTH y, sobre todo, con hCG.

Su cuantificación se realiza mediante inmunoensayos de tipo ensayo inmunorradiométrico, ELISA o quimioluminiscente automatizado. Uno de los laboratorios lo implementará en breve por LC-MS-MS.

DHEA y DHEA-S. La secreción de DHEA y de DHEA-S es principalmente de origen suprarrenal, aunque las gónadas también los sintetizan como producto intermediario en la cadena que lleva a andrógenos y estrógenos. Es el principal esteroide producido por las suprarrenales del feto, y su producción disminuye rápidamente después del nacimiento. En la evolución ontógena de sus concentraciones plasmáticas basales se detectan concentraciones bajas e iguales en ambos sexos a lo largo de la infancia hasta detectarse aumentos significativos unos dos años antes del inicio de la pubertad gonadal, en ambos sexos, fenómeno que se denomina adrenarquia^(12,13). Sus concentraciones siguen aumentando después a lo largo de la pubertad hasta alcanzar los niveles del adulto. A partir de la edad de la menopausia en la mujer y en el hombre de edad avanzada se produce una disminución significativa y progresiva de las concentraciones plasmáticas de DHEA y DHEA-S. Este hecho, unido a que el DHEA-S es el esteroide que circula en mayor concentración en la sangre periférica (superior a la del cortisol), ha hecho que se le busquen acciones biológicas directas a través de unos receptores potenciales, todavía por describir, o indirectas a través de metabolitos producidos localmente, y que se intenten hallar situaciones de deficiencia que podrían beneficiarse de su administración sustitutiva.

Su producción está muy aumentada en una gran proporción de carcinomas de la corteza suprarrenal, por lo que su cuantificación es imprescindible en el marco del estudio de estados de hiperandrogenismo de posible origen tumoral. Las concentraciones muy elevadas de DHEA y DHEA-S suelen ser diagnósticas de carcinoma suprarrenal.

nal. Sus niveles están aumentados, aunque proporcionalmente mucho menos, en el hiperandrogenismo funcional suprarrenal de la mujer adulta joven, y están elevados para la edad, aunque acordes con el estadio de vello pubiano, en la adrenarquia prematura que puede afectar a ambos sexos, aunque es más frecuente en la niña.

Junto con la 17-OH-pregnenolona, constituyen los parámetros diagnósticos del déficit enzimático de 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (gen *HSD3B2*), que, en su forma clásica, provoca una hiperplasia suprarrenal congénita con pérdida de sal y un desarrollo sexual diferente 46,XX en la niña y un desarrollo sexual diferente 46,XY en el niño. Las concentraciones basales son ya muy elevadas en estos casos. Las llamadas formas tardías o leves del déficit enzimático, que pueden detectarse como una adrenarquia prematura, no suelen corresponder a mutaciones en el gen *HSD3B2*, tal como han demostrado algunos estudios, aunque en algunos casos sí han podido detectarse mutaciones en dicho gen. En estos casos, es necesario realizar un test de estimulación suprarrenal con ACTH para estudiar la respuesta de la DHEA.

No existe ningún inmunoensayo comercializado para la medición de la DHEA. Uno de los laboratorios puede solicitar su determinación por LC-MS-MS a un laboratorio externo.

El DHEA-S se mide en todos los laboratorios consultados mediante un inmunoensayo quimioluminiscente automatizado, aunque puede determinarse por LC-MS-MS⁽¹⁶⁾.

17-OH-pregnenolona. Es el esteroide precursor de la DHEA o de la 17-OH-progesterona y el producto de la transformación de la pregnenolona a través de la enzima 17- α -hidroxilasa (Figuras 1 y 2).

Constituye el marcador más sensible del déficit de 3- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (gen *HSD3B2*), que, en su forma clásica o grave, presenta unas concentraciones basales muy elevadas. Las formas menos graves o no clásicas requieren, para su diagnóstico, la estimulación con ACTH.

Para su medición en el suero no existe actualmente ningún inmunoensayo comercializado. Su medición más sensible y específica es por LC-MS-MS⁽¹⁶⁾. Uno de los laboratorios puede externalizar esta medición en casos de interés.

Progesterona y pregnenolona. Constituyen los precursores respectivos de la 17-OH-P y de la 17-OH-pregnenolona sobre los que actúa la 17- α -hidroxilasa (Figuras 1 y 2), por lo que consti-

tuyen los principales marcadores bioquímicos del déficit enzimático de 17- α -hidroxilasa, cuya prevalencia es muy baja, y que provoca un síndrome de hipertensión arterial con hipopotasemia, un desarrollo sexual diferente 46,XY en el sexo masculino y una amenorrea primaria en el femenino. El diagnóstico bioquímico se realiza por las concentraciones elevadas de progesterona frente a las concentraciones disminuidas de los esteroides que le siguen en la cadena biosintética, en condiciones basales o tras la estimulación con ACTH.

Por otra parte, la progesterona es el principal producto del cuerpo lúteo ovárico, por lo que su cuantificación es importante en la evaluación de la función ovárica.

La progesterona se mide en el suero mediante inmunoensayos quimioluminiscentes automatizados (siete de los ocho laboratorios), aunque su medición más específica es por LC-MS-MS⁽¹⁵⁾.

Para la medición de la pregnenolona en el suero no existe ningún inmunoensayo comercializado, por lo que su medición deberá ser mediante LC-MS-MS. Uno de los laboratorios puede externalizar las muestras de interés.

4.2. Respuesta de los precursores del cortisol a la estimulación con ACTH

El diagnóstico de los déficit enzimáticos suprarrenales requiere, en la mayoría de los casos, la comprobación del aumento excesivo de los esteroides precursores frente a la disminución de los que subsiguen normalmente. En los déficits graves, o formas clásicas, la estimulación con ACTH puede incluso realizarse bajo tratamiento sustitutivo con glucocorticoides y mineralocorticoides. De todos los déficits enzimáticos que afectan a la corteza suprarrenal, ya hemos dicho que el más frecuente es el de la 21-hidroxilasa (gen *CYP21A2*). Los patrones de respuesta normal de la 17-OH-P a la estimulación con ACTH (0,25 mg intravenosos) a los 30 o a los 60 minutos han sido establecidos por numerosos autores, aunque los más utilizados constituyen el llamado nomograma de MI New, en el que existe una relación lineal entre las concentraciones basales y las obtenidas a los 60 minutos de la prueba (lo mismo ocurre para la androstenodiona). Existe una distribución de puntos según la cual las formas clásicas perdedoras de sal del síndrome presentan los valores más elevados, las formas no clásicas presentarían concentraciones algo más bajas, los portadores heterocigotos podrían presentar concentraciones algo elevadas en algunos casos, aunque no en todos ellos, y la población normal no portadora, genéticamente estudiada, presentaría los valores más bajos.

Ya se ha indicado en los apartados anteriores que la respuesta de la DHEA y de la 17-OH-pregnenolona debe estudiarse para diagnosticar el déficit de 3- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (gen *HSD3B2*); la del 11-desoxicortisol, para estudiar el déficit de 11- β -hidroxilasa (gen *CYP11B1*); y la de la progesterona, para el déficit de 17- α -hidroxilasa (gen *CYP17A1*). Los límites que deben sobrepasar los precursores bajo estimulación con ACTH para poder ser considerados como indicadores de déficit enzimático congénito y, por lo tanto, susceptibles de diagnóstico molecular han ido aumentando a lo largo de los últimos años, al observarse que existen estados de deficiencia enzimática funcional o adquirida sin mutación detectable y cuya expresión varía con el tiempo de evolución.

Las respuestas del cortisol y de sus precursores a la estimulación con ACTH, en los dos sexos, en función de la edad y del estadio de maduración puberal, se observan en Audí y Granada ^(12,13).

Un esteroide que ha sido determinado en el diagnóstico de homocigotos y, sobre todo, de heterocigotos de la deficiencia de 21-hidroxilasa es el 21-desoxicortisol, esteroide que normalmente apenas se detecta en la sangre periférica y que está aumentado en la deficiencia enzimática. Constituye, actualmente, el mejor parámetro sérico para seguir el tratamiento del déficit de 21-hidroxilasa. No existe ningún inmunoensayo comercializado, por lo que debe medirse mediante LC-MS-MS ⁽¹⁵⁾. No se está implementando en ninguno de los laboratorios consultados, aunque uno de ellos lo puede externalizar y está preparando su implementación mediante LC-MS-MS.

4.3. Respuesta de los precursores del cortisol a la supresión con dexametasona

Los precursores del cortisol pueden determinarse en el suero bajo tratamiento sustitutivo con glucocorticoides y, eventualmente, con mineralocorticoides en los déficits enzimáticos (ya se ha indicado que, en el caso del déficit de 21-hidroxilasa, los mejores parámetros son la androstenodiona y, mejor aún, el 21-desoxicortisol).

La supresión del cortisol y de algunos precursores que puedan estar elevados debe estudiarse en los síndromes de Cushing con o sin hiperandrogenismo. Ya se han indicado los diversos protocolos existentes de administración de dexametasona.

5. Estudio de la secreción suprarrenal de mineralocorticoides

La función mineralocorticoide depende de la aldosterona en un 95%, y de sus precursores y

del cortisol en una proporción mucho menor. La aldosterona se sintetiza exclusivamente en la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal, cuyas células expresan las enzimas necesarias para la transformación de la corticosterona en aldosterona (Figura 1). Entre sus precursores, la 18-hidrocorticosterona se forma principalmente en la glomerulosa y su secreción es paralela a la de la aldosterona, mientras que la corticosterona y la DOCA se sintetizan en la zona fasciculada y su secreción es paralela a la del cortisol. La secreción de aldosterona está regulada fundamentalmente por el sistema renina-angiotensina y el ion potasio, aunque la ACTH, el factor natriurético atrial y el ion sodio, entre otros, tienen un efecto modulador. Se establece un circuito de regulación entre la acción mineralocorticoide sobre la retención de sodio y la tensión arterial, y la actividad del eje renina-angiotensina-aldosterona. La disminución de la presión arterial o la disminución de la perfusión renal estimulan la liberación de renina, que actúa sobre su sustrato de origen hepático, el angiotensinógeno, y lo transforma en angiotensina I. Sobre ésta actúan las enzimas convertoras de la angiotensina de origen pulmonar y dan lugar a la forma activa, la angiotensina II. La angiotensina II es una hormona con una potente acción vasoconstrictora y, además, actúa sobre la glomerulosa suprarrenal, donde estimula la síntesis de aldosterona cuyo efecto es la retención de sodio por el túbulo renal.

5.1. Determinación basal de aldosterona en el suero y en la orina

La aldosterona es el mineralocorticoide endógeno con mayor actividad biológica y el último producto de la biosíntesis de mineralocorticoides. Su secreción, de tipo pulsátil, presenta un ritmo circadiano paralelo al del cortisol, pero que no está relacionado con la secreción de ACTH. Su secreción está muy influenciada por los cambios hemodinámicos y el estrés.

La interpretación de las concentraciones séricas de aldosterona deberá, por lo tanto, tener en cuenta la existencia de un ritmo circadiano, el estado de reposo o actividad del paciente, los cambios posturales y la ingestión de sodio durante los últimos días.

Las concentraciones basales de aldosterona son elevadas en el recién nacido y presentan un amplio intervalo de variación durante el primer año de vida ^(12,13); después, disminuye el intervalo de variación hasta que se establecen niveles similares a los del adulto a partir de los 8-9 años de edad.

Las concentraciones séricas de aldosterona aumentan bajo estimulación con ACTH, aunque este tipo de estímulo se utiliza poco ^(12,13).

Las determinaciones de aldosterona sérica deben siempre acompañarse de la renina o de la actividad de la renina, con el fin de poder evaluar el estado del eje renina-angiotensina-aldosterona.

La mayoría de los laboratorios (seis de ocho) determina la aldosterona sérica mediante un inmunoanálisis quimioluminiscente automatizado, mientras que dos de ocho la determinan mediante un radioinmunoensayo.

La determinación de la excreción urinaria de la aldosterona intacta permite evaluar la secreción integrada de aldosterona durante las 24 horas del día. La mayoría de los laboratorios utilizan la misma técnica automatizada que para el suero, aunque la orina debe recogerse refrigerada y la muestra que se va a analizar debe hidrolizarse previamente (hidrólisis del glucurónido de aldosterona).

5.2. Determinación de la actividad de la renina plasmática (angiotensina I)

El estímulo presor ejercido sobre las células de la cápsula de Bowman regula la síntesis de la renina, la cual transforma el péptido angiotensinógeno de origen hepático en angiotensina I y, a su vez, la angiotensina I es transformada en angiotensina II por una enzima de conversión (enzima convertidora de la angiotensina).

La medición de la actividad renina plasmática consiste en cuantificar, mediante un inmunoensayo, la concentración de angiotensina I generada en una muestra de plasma tras incubación a 37 °C durante un tiempo controlado. Ello permite conocer la cantidad de angiotensina I presente y generada a partir del angiotensinógeno a través de la renina presente. Ha resultado ser un excelente parámetro para evaluar el eje renina-angiotensina-aldosterona. Las muestras de plasma deben separarse y congelarse inmediatamente después de la centrifugación a temperatura ambiente para evitar la generación *in vitro* de renina a partir de la prorenina.

Sus concentraciones son elevadas en el recién nacido y presentan, similarmente a las de aldosterona, un amplio intervalo de variación durante la primera infancia^(12,13,17). La actividad de la renina plasmática depende de la actividad física, la postura y la ingestión de sodio. En condiciones ideales, las muestras de sangre para la determinación de niveles basales deben obtenerse tras un reposo mínimo de 30 minutos y en decúbito supino, en pacientes a los que se ha retirado la medicación.

El cociente aldosterona en plasma/actividad de la renina plasmática se utiliza como prueba de cri-

bado del hiperaldosteronismo. El hallazgo de un cociente aldosterona/renina elevado (>30) permite orientar el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario, aunque deberá confirmarse mediante pruebas funcionales, como la supresión con suero salino o la prueba de captopril. Posteriormente, habrá que realizar estudios morfológicos o cateterización de las venas suprarrenales para determinar si se debe a un adenoma, única causa potencialmente curable de hiperaldosteronismo primario, o se trata de una hiperplasia, la cual sería tributaria de tratamiento médico.

Entre los laboratorios consultados, cuatro de ocho la determinan mediante un radioinmunoensayo comercializado.

5.3. Determinación de la renina plasmática

Las concentraciones plasmáticas de la proteína renina pueden también medirse mediante inmunoanálisis directos. Se utilizan análisis inmuno-métricos con dos anticuerpos monoclonales específicos contra la molécula. Esta determinación presenta algunas ventajas respecto a la determinación clásica de la actividad de la renina, ya que no depende de la disponibilidad del sustrato, el angiotensinógeno, y además no se ve afectada por la presencia de activadores o inhibidores plasmáticos. Por otro lado, la realización de estos ensayos es metodológicamente más simple, ya que no se realiza la activación de la renina, que implica cambios en el pH y en la temperatura. Los principales inconvenientes de los inmunoanálisis para medir la renina son la escasa sensibilidad analítica y la presencia de reacciones cruzadas con la prorenina, aunque últimamente estos aspectos negativos están mejorándose.

También se observa en pediatría una disminución rápida de las concentraciones de la renina a lo largo del primer año de vida, aunque los patrones de normalidad no están todavía bien establecidos⁽¹⁷⁾.

Cuatro de los ocho laboratorios determinan la renina plasmática mediante un inmunoanálisis quimioluminiscente automatizado.

5.4. Determinación de los precursores de la aldosterona

Los precursores de la aldosterona en la vía de la esteroidogenia de los mineralocorticoides son la corticosterona y la DOCA (Fig. 1). Su cuantificación no es habitual en la clínica humana; sin embargo, es importante poder realizarla en el marco del diagnóstico diferencial de los síndromes congénitos de hipoaldosteronismo aislado por posible déficit de las actividades enzimáticas CMO-I

y CMO-II (gen *CYP11B2*) con el fin de demostrar el nivel del déficit enzimático. Las concentraciones de DOCA y corticosterona están elevadas en el déficit congénito de 17- α -hidroxilasa (gen *CYP17A1*) por hiperestimulación por la ACTH debido al déficit de la 17- α -hidroxilación, mientras que la aldosterona está disminuida debido a la supresión de la secreción de renina provocada por el aumento de presión consecuentemente al gran aumento de la DOCA y la corticosterona.

Las concentraciones basales presentan variaciones ontógenas a lo largo de la infancia, así como su respuesta a la estimulación con ACTH ^(12,13).

No existen actualmente inmunoensayos comercializados para la cuantificación de la DOCA ni de la corticosterona en el suero, por lo cual seis de los ocho laboratorios no las determinan, y dos de los ocho las pueden cuantificar mediante LC-MS-MS (*in situ* o en un laboratorio externo).

5.5. Pruebas dinámicas para el estudio de la secreción de aldosterona

El diagnóstico diferencial de los síndromes de hiperaldosteronismo precisa el estudio de la respuesta de la secreción suprarrenal de aldosterona a la supresión o la estimulación del eje renina-angiotensina-aldosterona.

Pruebas de estimulación. Algunas pruebas utilizan el estímulo que supone el cambio postural (de decúbito supino a posición erecta), la deambulación o una combinación de ambos estímulos. La prueba se inicia a las 8:00 horas colocando un catéter intravenoso con el paciente en reposo y en posición supina, y a los 30 minutos se extrae una muestra basal para la determinación de la aldosterona, la actividad de la renina plasmática y el cortisol. Después de al menos una hora de deambulación, se extrae una nueva muestra para determinar los mismos parámetros que en el tiempo basal. En individuos normales, la concentración de aldosterona tras la deambulación aumenta entre dos y cuatro veces respecto a la basal. En los pacientes con aldosteronismo, el incremento de la aldosterona es menor o, incluso, puede disminuir en pacientes con adenoma. Se utilizan poco dado su baja sensibilidad (64%) y especificidad (70%) para diferenciar entre adenoma e hiperplasia.

Pruebas de supresión. Una prueba utilizada consiste en la expansión del volumen intravascular mediante la infusión de suero salino isotónico por vía intravenosa durante 2-4 horas, realizando la determinación de la actividad de la renina plasmática, la aldosterona y el cortisol basales y después de la infusión. En individuos normales se

observa una supresión de la actividad de la renina, un descenso de las concentraciones de la aldosterona (< 5 ng/dL) y una disminución de las concentraciones del cortisol, que es apropiada a su ritmo circadiano. La presencia de una concentración de aldosterona tras la infusión superior a 10 ng/dL confirma que su producción es autónoma.

Prueba del captopril. El captopril es un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, responsable del paso de angiotensina I a angiotensina II, que bloquea su acción presora y la estimulación de la síntesis de aldosterona. Su administración en individuos normales o en pacientes con hipertensión arterial esencial produce una disminución de la aldosterona (<15 ng/dL) y un aumento de la actividad de la renina plasmática. Esta prueba permite diferenciar el hiperaldosteronismo primario debido a un adenoma productor de aldosterona, en el que no se observa modificación de la concentración de la aldosterona, del causado por una hiperplasia idiopática, en el que suele observarse un cierto descenso.

La prueba de supresión con dexametasona permite diagnosticar el aldosteronismo primario susceptible de supresión por glucocorticoides, un caso poco frecuente de hiperaldosteronismo que es dependiente de la producción de ACTH. Se trata del hiperaldosteronismo familiar de tipo I, secundario a la formación de un gen anómalo en el cromosoma 8 al producirse un mal apareamiento de los genes *CYP11B1* y *CYP11B2* durante la meiosis. Este gen híbrido que codifica para la síntesis de aldosterona determina entonces que dicha síntesis esté bajo control de la ACTH y no del sistema renina-angiotensina. La prueba consiste en determinar la concentración plasmática de aldosterona antes y después de administrar dexametasona por vía oral. El hallazgo de una concentración de aldosterona tras la administración de dexametasona inferior al 80% respecto a la basal o inferior a 4 ng/dL permite el diagnóstico con una sensibilidad del 92% y una especificidad del 100%.

6. Medición en la orina de precursores, glucocorticoides, mineralcorticoides, andrógenos y sus metabolitos

Hemos mencionado la medición mediante LC-MS-MS del cortisol y de la cortisona en la orina. Las técnicas de cromatografía líquida o de gases acopladas a espectrofotometría de masas (LC-MS-MS y GC-MS-MS) permiten medir la excreción urinaria de gran cantidad de esteroides derivados de síntesis suprarrenal y gonadal y de sus metabolismos periféricos. Su implementación tiene gran interés tanto a nivel diagnóstico como de investigación clínica.

El análisis en la orina de 24 horas del llamado metaboloma de esteroides no sólo permite el diagnóstico de los déficits enzimáticos congénitos de la esteroidogénesis, sino también de la producción excesiva autónoma de esteroides suprarrenales, lo que permite el diagnóstico diferencial entre diversas causas (exceso de producción de cortisol en adenomas secretores de cortisol, en carcinomas suprarrenales, en la hiperplasia suprarrenal bilateral macronodular o en la enfermedad adrenocortical nodular pigmentada primaria; exceso de producción de aldosterona en el hiperaldosteronismo primario unilateral o bilateral que puede ser hereditario; exceso autónomo de producción de andrógenos suprarrenales en los carcinomas suprarrenales; y, finalmente, excesiva producción combinada de precursores de andrógenos y de glucocorticoides en los carcinomas suprarrenales) (7).

Pocos laboratorios de hospitales públicos están equipados para ello. Sólo uno de los ocho consultados implementa un panel de esteroides urinarios (<http://cdb.hospitalclinic.org/catalogo-cdb/521421140/perfil-esteroides-orina>), aunque nos indica que no recibe muestras de pediatría, y otro puede solicitarlo a un laboratorio privado. De forma similar a la progresiva accesibilidad a los diagnósticos moleculares como consecuencia de la implementación de técnicas de secuenciación masiva y de la disminución de costes, el análisis del llamado metaboloma de esteroides también se hará más accesible gracias a una progresiva simplificación y automatización de las técnicas. De todas formas, es lógico contemplar la utilización de laboratorios de referencia, nacionales e internacionales, para el procesamiento de las muestras de interés, en el marco del diagnóstico de enfermedades raras o complejas o de estudios controlados.

Conclusiones

Las técnicas de inmunoensayo automatizado permiten medir con gran rapidez y suficientes especificidad y sensibilidad las concentraciones en líquidos biológicos (suero o plasma, en algunos casos, saliva y orina) de muchas de las hormonas implicadas en la función hipotalámico-hipofisaria-suprarrenal (proteínas y esteroides). Las técnicas más específicas y cuando no existen inmunoensayos comercializados son la cromatografía líquida o la de gases acoplada a espectrofotometría de masas, que permiten la medición simultánea de varios esteroides en el suero o en la orina. Existen numerosas pruebas funcionales que permiten estimular o suprimir determinadas secreciones y, con ello, analizar el estado funcional de la secreción. En cada caso habrá que tener en cuenta la edad del paciente y los valores de referencia, así como la bioquímica general (ionograma, urea, crea-

tinina, hemograma), que permiten evaluar el estado metabólico del paciente.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses alguno en relación con este artículo.

Referencias Bibliográficas

1. Pignatti E, Flück CE. Adrenal cortex development and related disorders leading to adrenal insufficiency. *Mol Cell Endocrinol* 2021; 527: 111206.
2. Kelberman D, Dattani MT. Hypothalamic and pituitary development: novel insights into the aetiology. *Eur J Endocrinol* 2007; 157 (Suppl 1): S3-14.
3. Couture C, Saveanu A, Barlier A, Carel JC, Fassnacht M, Flück CE, et al. Phenotypic homogeneity and genotypic variability in a large series of congenital isolated ACTH-deficiency patients with TPIT gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E486-95.
4. Patti G, Guzzeti C, Di Iorgi N, Maria Allegri AE, Napoli F, et al. Central adrenal insufficiency in children and adolescents. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2018; 32: 425-44.
5. Flück CE, Meyer-Böni M, Pandey AV, Kempná P, Miller WL, et al. Why boys will be boys: two pathways of fetal testicular androgen biosynthesis are needed for male sexual differentiation. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 201-18. Erratum in *Am J Hum Genet* 2011; 89: 347.
6. Turcu AF, Rege J, Auchus RJ, Rainey WE. 11-oxygenated androgens in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2020; 16: 284-96.
7. Storbeck KH, Schiffer L, Baranowski ES, Chortis V, Prete A, Barnard L, et al. Steroid metabolome analysis in disorders of adrenal steroid biosynthesis and metabolism. *Endocr Rev* 2019; 40: 1605-25.
8. Tatsi C, Stratakis CA. Neonatal Cushing syndrome: a rare but potentially devastating disease. *Clin Perinatol* 2018; 45: 103-18.
9. Moreira AC, Antonini SR, de Castro M. Mechanisms in endocrinology: a sense of time of the glucocorticoid circadian clock: from the ontogeny to the diagnosis of Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 2018; 179: R1-18.
10. Janner M, Sommer G, Groessl M, Flück CE. Premature adrenarche in girls characterized by enhanced 17,20-lyase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: dgaa598.

11. Cavalcante LBCP, Freitas TC, Musolino NRC, Cescato VAS, Silva GO, Fragoso MCBV, et al. High accuracy of bilateral and simultaneous petrosal sinus sampling with desmopressin for the differential diagnosis of pediatric ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Pituitary* 2020; 23: 507-14.
12. Audí Parera L, Granada Ybern ML. Métodos de exploración de la función suprarrenal. En Diéguez C, ed. *Actualizaciones en endocrinología 4: glándulas suprarrenales*. 2 ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España; 2008.
13. Audí Parera L, Granada Ybern ML. Valores de referencia en endocrinología pediátrica. En Pombo M, Audí L, Bueno M, Calzada R, Cassola F, Diéguez C, et al, eds. *Tratado de endocrinología pediátrica*. 4 ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España; 2009.
14. Greff MJE, Levine JM, Abuzgaia AM, Elzagallaai AA, Rieder MJ, van Uum SHM. Hair cortisol analysis: an update on methodological considerations and clinical applications. *Clin Biochem* 2019; 63: 1-9.
15. Kulle AE, Welzel M, Holterhus PM, Riepe FG. Implementation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for eight adrenal C-21 steroids and pediatric reference data. *Horm Res Paediatr* 2013; 79: 22-31.
16. Kulle AE, Reinehr T, Simic-Schleicher G, Hornig NC, Holterhus PM. Determination of 17-OH-Preg and DHEAS by LC-MS/MS: impact of age, sex, pubertal stage, and BMI on the $\Delta 5$ steroid pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102: 232-41.
17. Burdman I, Burckhardt BB. Prorenin and active renin levels in paediatrics: a bioanalytical review. *Clin Chem Lab Med* 2020; 59: 275-85.