



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS
Y DE LA SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

**"DISEÑO Y ELABORACIÓN DE PRUEBA *EX VIVO* EN PAPEL DE NITROCELULOSA
PARA LA DETERMINACIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE HORMONA PARATIROIDEA
EN PACIENTE CON HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO NO FAMILIAR (PTH_{eP})"**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS Y ODONTOLÓGICAS DE LA SALUD

PRESENTA:

RAFAEL HUMBERTO PÉREZ SOTO

TUTOR PRINCIPAL:

DR. MIGUEL FRANCISCO HERRERA HERNÁNDEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

MIEMBROS DE COMITÉ TUTORIAL:

DR. DAVID VELÁZQUEZ FERNÁNDEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

DR. ANTONIO MORENO GUZMÁN
ESCUELA MILITAR DE MEDICINA

DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS
RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	4
<u>1.1 ANTECEDENTES</u>	4
<u>1.1.1 GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD</u>	4
<u>1.1.2 EFECTOS SISTÉMICOS PRINCIPALES DE LA PTH</u>	4
<u>1.1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DEL HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO</u>	5
<u>1.1.4 DIAGNÓSTICO DEL HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO</u>	5
<u>1.1.5 CARACTERÍSTICAS DE LA PTH</u>	6
<u>1.1.6 TRATAMIENTO DEL HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO E IMPORTANCIA DE LA MEDICIÓN INTRAOPERATORIA DE LA PTH (PTHio)</u>	9
<u>1.2 MARCO TEÓRICO</u>	12
<u>1.2.1 ESTÁNDARES DE LA OMS PARA DISPOSITIVOS DE DIAGNÓSTICO</u>	12
<u>1.2.2 MECANISMOS DE LOS DISPOSITIVOS DIAGNÓSTICOS</u>	12
<u>1.2.3 TÉCNICAS DE ELISA</u>	13
<u>1.2.4 PARTICULARIDAD DE LA MEDICIÓN DE LA PTHio</u>	14
2. <u>HIPÓTESIS DE TRABAJO</u>	14
3. <u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	15
4. <u>JUSTIFICACIÓN</u>	15
5. <u>OBJETIVOS</u>	15
6. <u>METODOLOGÍA</u>	16
<u>6.1 ESTRATEGIA DEL ESTUDIO</u>	16
<u>6.1.1 ETAPA DE DISEÑO Y ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA</u>	16
<u>6.1.2 ETAPA DE VALIDACIÓN</u>	22
<u>6.1.3 ETAPA DE SEGUIMIENTO</u>	22
<u>6.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN</u>	22
<u>6.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN</u>	23
<u>6.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</u>	23
<u>6.2.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN</u>	23
<u>6.3 TAMAÑO MUESTRAL</u>	23
<u>6.3.1 CÁLCULO PARA H1</u>	23
<u>6.3.2 CÁLCULO PARA H2</u>	24
<u>6.3.3 CÁLCULO PARA H3</u>	24
<u>6.4 VARIABLES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO</u>	25
<u>6.4.1 VARIABLES DEPENDIENTES</u>	25
<u>6.4.2 VARIABLES INDEPENDIENTES</u>	25
<u>6.5 IMPLICACIONES ÉTICAS</u>	27
7. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	28

8. <u>RESULTADOS</u>	29
<u>8.1 COHORTE DE LA FASE DE DISEÑO Y ESTANDARIZACIÓN</u>	29
<u>8.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS EN FASE DE DISEÑO Y ESTANDARIZACIÓN</u>	30
<u>8.2.1 PRUEBA EXPERIMENTAL</u>	31
<u>8.3 PROBLEMAS IDENTIFICADOS</u>	34
<u>8.4 FASE DE SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES</u>	35
9. <u>DISCUSIÓN</u>	36
10. <u>LIMITACIONES DEL ESTUDIO</u>	38
11. <u>PERSPECTIVA FUTURAS</u>	38
12. <u>CONCLUSIÓN</u>	38
13. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	40
14. <u>ANEXOS</u>	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD

El hiperparatiroidismo primario (HPTP) es una condición clínica patológica caracterizada por hipercalcemia e hipercalciuria ocasionada por la elevación anormal en plasma de la hormona paratiroidea (PTH). El HPTP es la tercera enfermedad endocrinológica más frecuente después de la diabetes mellitus y la enfermedad tiroidea; y es la primera causa de hipercalcemia en el paciente ambulatorio.¹

Su incidencia estimada varía entre 0.4 y 82 casos por cada 100,000 personas. Las principales causas del HPTP son: la presencia de un adenoma paratiroideo solitario en 80-85% de los casos, hiperplasia de las 4 glándulas en 10-15%, múltiples adenomas en 5% y cáncer paratiroideo en menos del 1 % de los casos. En todas estas formas de HPTP, existe una pérdida de la retroalimentación negativa de los niveles de calcio séricos sobre la síntesis y secreción de la PTH por las células principales de las glándulas paratiroideas, o debido al incremento en la masa celular paratiroidea y/o a una reducción en el número de receptores sensibles al calcio en la superficie membranal de la célula principal paratiroidea. Como resultado de esto, se requieren niveles de calcio mayores para suprimir la PTH.²

1.1.2 EFECTOS SISTÉMICOS PRINCIPALES DE LA PTH

La PTH tiene principalmente dos órganos blancos, el hueso y el riñón. En el hueso, la PTH actúa sobre los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos estimulando la síntesis de glucógeno y el transporte de (1-14C)-2-deoxi-D-glucosa. El efecto final de la hormona sobre el hueso puede ser tanto anabólica como catabólica y depende principalmente de la concentración y la periodicidad de estímulo de la hormona sobre su receptor.³⁻⁴ En el riñón, la hormona induce su efecto a través del incremento en la síntesis de la forma activa de la vitamina D (1,25(OH)₂D₃) lo que conlleva un aumento en la reabsorción tubular de calcio y en la excreción de fosfato en los túbulos renales.⁴ A pesar de este incremento en la reabsorción del calcio, los pacientes con HPTP pueden presentar una hipercalciuria

marcada. Este fenómeno es debido a una mayor cantidad de calcio en el filtrado glomerular que sobrepasa la capacidad de reabsorción tubular renal.⁵

1.1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DEL HPTP

En la actualidad 80% de los pacientes se presentan de forma asintomática o subclínica, aunque recientemente se ha documentado que la mayoría de los pacientes presentan algún síntoma o afección en órganos blancos secundario al HPTP. El 20% restante presentan el cuadro clásico o con semiología variable del HPTP que puede incluir la presencia de hipercalcemia marcada, osteítis fibrosa quística, dolor óseo, fracturas patológicas (vertebrales particularmente), desmineralización ósea u osteoporosis, tumores pardos, quistes óseos, urolitiasis, nefrolitiasis o hasta nefrocalcinosis, poliuria, polidipsia, insuficiencia renal, anorexia, constipación, enfermedad ácido péptica, pancreatitis, debilidad muscular, alteraciones mentales o diferentes grados de fatiga.² Además, estos pacientes presentan un mayor riesgo de muerte cardiovascular cuando presentan hiperparatiroidismo severo con niveles séricos de calcio por arriba de 12 mg/dL o crisis hipercalcémicas.⁶

1.1.4 DIAGNÓSTICO DEL HPTP

El diagnóstico del HPTP es esencialmente bioquímico y para el mismo es necesario medir: niveles de calcio sérico total, fósforo, PTH, creatinina, 25-OH vitamina D y niveles de calcio y creatinina en orina de 24 horas, este último para realizar el diagnóstico diferencial con hipercalcemia hipocalciúrica familiar.⁷ El perfil bioquímico típico del HPTP consiste en hipercalcemia más hiperparatironinemia (PTH elevada) con hipofosfatemia y rangos normales de vitamina D y creatinina séricas (Figura 1).

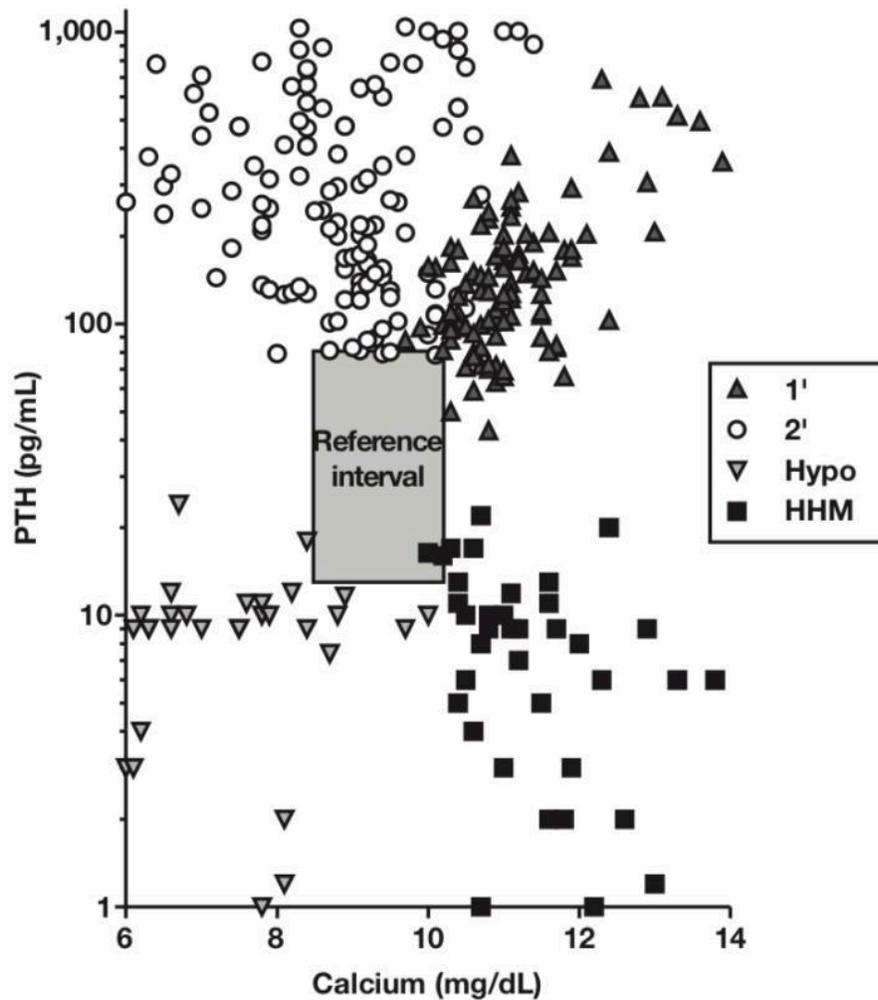


Figura 1. Dispersograma que muestra la distribución de la PTH y el calcio sérico en pacientes con HPTP (1'), hiperparatiroidismo secundario (2'), hipoparatiroidismo (Hypo) e hipercalcemia humoral independiente de PTH (HHM).⁸

1.1.5 CARACTERÍSTICAS DE LA PTH

La PTH es una hormona peptídica (proteína grande) de 12,861 Dáltones compuesta por 115 aminoácidos, pero con un fragmento postraduccional activo de 84 (posterior a la edición del péptido señal y el propéptido como se muestra en la figura 2). Es codificada por el gen homólogo (*PTH*) en el locus 11p15.3, cuya transcripción es regulada positivamente por AUF1 (factor de unión a elementos ricos en secuencia AU tipo 1), KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*) y HNF1 β (factor nuclear

del hepatocito 1 β); y negativamente por los niveles de calcio y 1,25-dihidroxitamina D. Esta hormona es sintetizada y secretada por las células principales de las glándulas paratiroides dentro del retículo endoplásmico liso. Durante su procesamiento las dos primeras metioninas son escindidas para señalar su camino hacia vesículas de secreción, posteriormente dentro del aparato de Golgi una secuencia de 23 aminoácidos del N-terminal son escindidos para formar la proteína inactiva intermedia pro-PTH de 90 aminoácidos. Antes de ser almacenada en vesículas y gránulos secretores, un segmento de 6 aminoácidos del extremo N-terminal son escindidos en el aparato de Golgi. La hormona constituida de 84 aminoácidos es liberada al torrente sanguíneo por exocitosis y tiene una vida media de 3.5 a 4 minutos. Esta dinámica permite la utilización intraoperatoria de ensayos que cuantifican la PTH para determinar una resección quirúrgica exitosa de un adenoma paratiroideo hiperfuncional o hipersecretor. Dentro de las glándulas paratiroides, la PTH es procesada en fragmentos más pequeños por función de la catepsina-B, los cuales son secretados en conjunto con la molécula intacta de PTH. Estos fragmentos incluyen: PTH 1-37, PTH 1-34 que son biológicamente activos y PTH 7-34, PTH 7-84 que funcionan como antagonistas de baja afinidad de la PTH. Esta hormona categorizada como proteína grande se ha conservado a lo largo de la evolución de las especies como una hormona ortóloga, con una homología del 90 - 100% en los primates distintos al humano y del 50% con otros mamíferos como los de la especie bovina, canina y algunos roedores. De manera particular, la homología con la PTH específica de conejo es cercana a 77% (figura 3), lo que permite el uso de estos mamíferos para la elaboración de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína ortóloga de la especie humana.⁹⁻¹⁰

Los niveles de PTH deben ser medidos con un ensayo de segunda generación para PTH molécula intacta o un ensayo de tercera generación; esto con la finalidad de evitar la cuantificación de fragmentos no activos o con actividad opuesta a la PTH como lo son la molécula 7-84 de la PTH o los fragmentos largos C-terminales del péptido.¹¹ En nuestro hospital los valores normales de PTH en sangre oscilan entre 12 y 88 pg/mL.

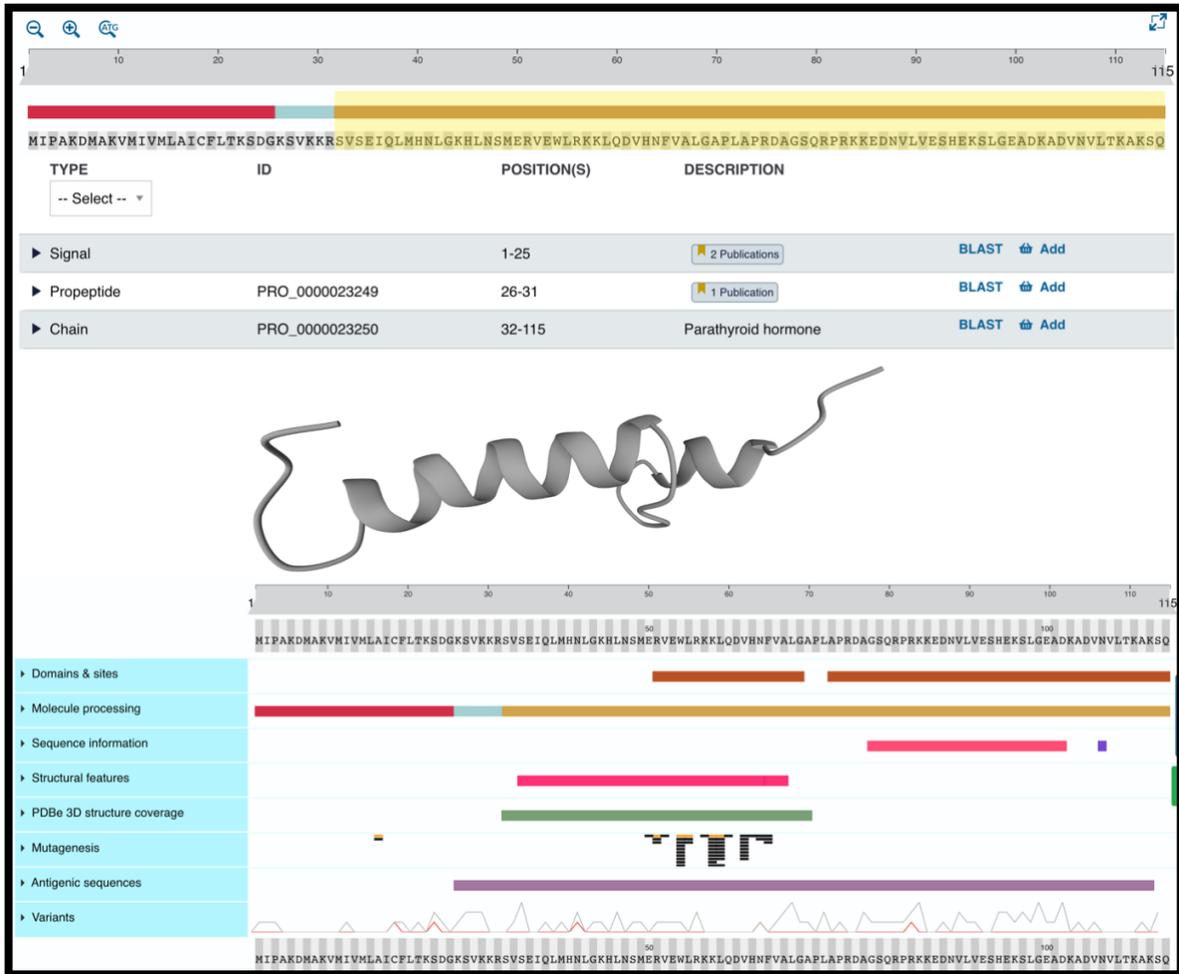


Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la proteína PTH de acuerdo con el sitio UniProt en el que se muestra la edición postraduccional de la hormona y la secuencia activa de la misma.

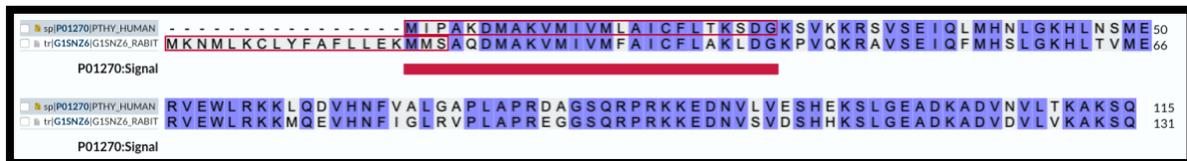


Figura 3. Análisis comparativo de la estructura de aminoácidos de la PTH humana y PTH de conejo.

1.1.6 TRATAMIENTO DEL HPTP E IMPORTANCIA DE LA MEDICIÓN INTRAOPERATORIA DE LA PTH (PTHio)

La paratiroidectomía es el único tratamiento curativo para el HPTP por lo que actualmente se considera el estándar de oro. Se recomienda en todos los pacientes sintomáticos y en pacientes asintomáticos según *The Fourth International Workshop for the Management of Asymptomatic primary hyperparathyroidism*, en pacientes con uno o más de los siguientes criterios: niveles de calcio > 1mg/dL por arriba del límite superior normal, presencia de osteoporosis severa (T score < -2.5 unidades T) o fracturas patológicas vertebrales documentadas por imagen, presencia de un filtrado glomerular menor a 60 mL/min, hipercalciuria moderada (mayor a 250-300 mg/día dependiendo del sexo del paciente), riesgo incrementado de urolitiasis o un perfil de riesgo para urolitiasis positivo o con evidencia de nefrolitiasis oculta o nefrocalcinosis en estudios de imagen y en aquellos pacientes mayores de 50 años de edad.¹¹

La exploración cervical bilateral ha sido aceptada por muchas décadas como el estándar de oro para el manejo del HPTP principalmente cuando los estudios de localización preoperatoria no son concluyentes o discordantes, mientras que la eficiencia terapéutica depende principalmente de la habilidad quirúrgica y el juicio médico del cirujano tratante. En la actualidad hay una tendencia a sustituir la exploración cervical bilateral por la paratiroidectomía selectiva mínimamente invasiva con la finalidad de disminuir, dolor, tiempo quirúrgico, la incidencia de hipoparatiroidismo postoperatorio y la estancia hospitalaria, asegurando una tasa de éxito similar (Figura 4). Para su realización, es necesario realizar estudios precisos de localización preoperatoria y el uso de la determinación de PTH intraoperatoria (PTHio).¹² Las mediciones de PTHio se sustentan en el conocimiento de la vida media de la hormona, lo que permiten que las concentraciones de esta disminuyan rápidamente posterior a la exéresis del tejido paratiroideo anómalo.¹³ Irvin y cols¹⁴ fueron el grupo pionero en el desarrollo e implementación de la prueba rápida de PTHio, trabajo que posteriormente derivó en la elaboración de los criterios de Miami. Estos criterios hacen referencia a que una disminución de la PTHio > 50% con respecto a la medición pre-excisional a los 10 minutos de la exéresis de la glándula paratiroidea enferma predice con exactitud la afección de una sola glándula. En caso de que esta

disminución en los niveles de PTHio no ocurra, se requerirá de una exploración formal del resto de las glándulas. Además de los criterios de Miami, existen otros criterios descritos para predecir curación con base en los niveles de PTHio (Halle, Roma, Viena, etc.); sin embargo, los primeros tienen un valor predictivo superior para curación (Tabla 1).¹⁵⁻¹⁶

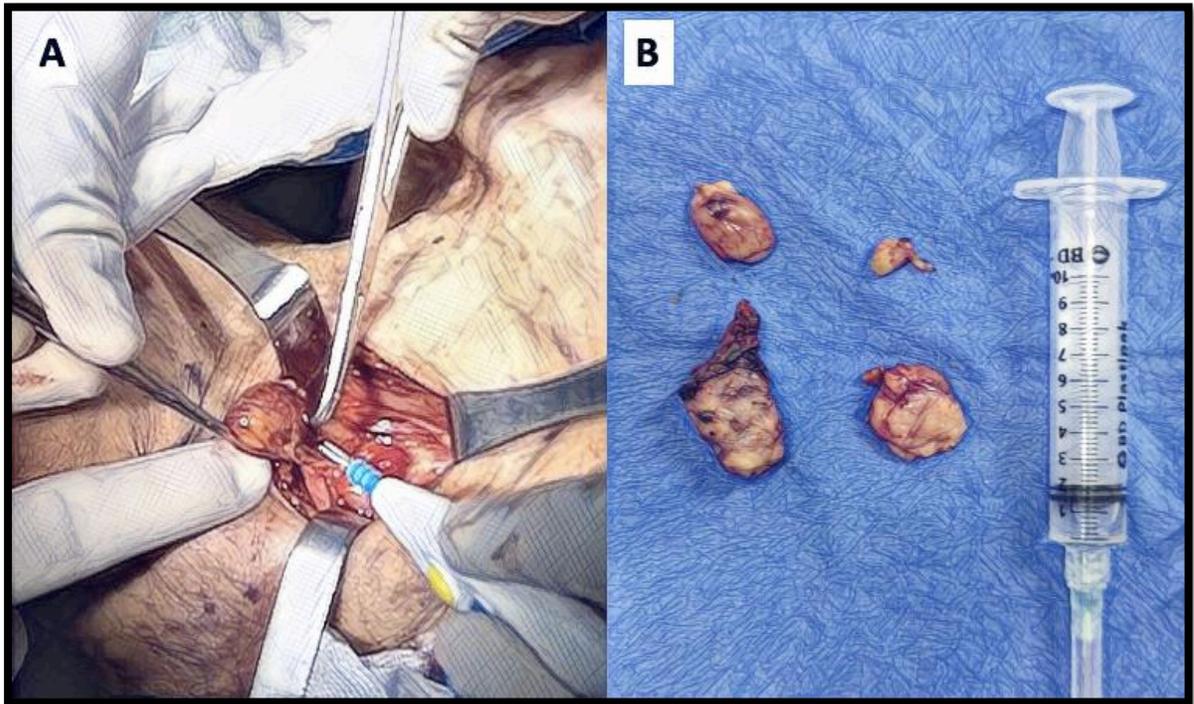


Figura 4. (A) Imagen de un adenoma paratiroideo tratado con paratiroidectomía selectiva. (B) Hiperplasia paratiroidea tratada con exploración cervical bilateral con paratiroidectomía subtotal.

La medición de la PTHio en conjunto con las técnicas de localización basadas en imagen, han ayudado a que la tasa promedio de curación rebase el 95% en centros con alta experiencia.¹⁷ Las tasas de persistencia (definido como hipercalcemia dentro de los primeros 6 meses del postoperatorio) y recurrencia (hipercalcemia posterior a 6 meses del postoperatorio) de la enfermedad, oscilan entre el 2.5 y 5% de los casos de HPTP esporádico en diferentes publicaciones.¹⁸

De tal manera, la determinación de los niveles séricos de la PTH, no sólo tiene un papel en el diagnóstico de los pacientes con hipercalcemia o sospecha de HPTP, sino que también su aplicación

durante la cirugía, lo que se conoce como PTHio, es de utilidad durante el procedimiento quirúrgico para confirmar la exéresis del tejido paratiroideo enfermo. Desafortunadamente, la determinación de la PTHio conlleva un incremento en los costos de la cirugía y requiere aproximadamente entre 20 a 30 minutos de procesamiento por cada muestra, tiempo en el cual el paciente se encuentra bajo los efectos de la anestesia.

Criterios	Descripción	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor Predictivo Positivo (%)	Valor predictivo negativo (%)	Exactitud (%)
Halle	Disminución en niveles de PTHio a valores normales (<35ng/L) a los 15 minutos después de la exéresis del tejido paratiroideo anómalo	62.9	100	100	14.2	65
Miami	Disminución en niveles de PTHio del 50% o mayor (con respecto a valor más alto preoperatorio o pre-excisional) a los 10 minutos después de la exéresis del tejido paratiroideo anómalo.	97.6	93.3	99.6	70	97.3
Roma	Disminución en niveles de PTHio > 50% (respecto al valor más alto pre-excisional) y/o concentración de PTHio en rango normal a los 20 minutos post-exéresis y/o 7.5ng/L por debajo del valor obtenido a los 10 minutos.	82.9	100	100	26.3	83.8
Viena	Disminución en niveles de PTHio de 50%o mayor (respecto al valor preincisional) a los 10 minutos de la exéresis	92.2	93.3	99.6	60.9	92.3

Tabla 1. Tabla comparativa entre los distintos criterios para predecir curación postoperatoria con PTHio en pacientes con HPTP sometidos a paratiroidectomía.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 ESTÁNDARES DE LA OMS PARA DISPOSITIVOS DE DIAGNÓSTICO

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), los elementos diagnósticos empleados en países en desarrollo deben de cumplir con los criterios ASSURED: *afordable* (costeable), *sensitive* (buena sensibilidad), *specific* (específico), *user-friendly* (amigable al uso), *rapid and robust* (rápido y robusto), *equipment free* (libres de dispositivos) *and deliverable to end-users* (y de fácil entrega al usuario).¹⁹

Los métodos de diagnóstico basados en papel son una nueva plataforma designada para la creación de ensayos diagnósticos basados en estos criterios. Estas herramientas han sido ampliamente utilizadas en el área de la salud y monitoreo de la calidad de alimentos y medio ambiente, con éxito. Son instrumentos de bajo costo, desechables y elaborados de materiales reutilizables que permiten realizar estudios diagnósticos con bajos volúmenes de líquido y escaso o nulo equipo de soporte ya que trabajan por capilaridad y evaporación, utilizando como método de medición una reacción colorimétrica, electroquímica o de fluorescencia.¹⁹

1.2.2 MECANISMOS DE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El concepto de utilizar nitrocelulosa/papel como base para el desarrollo de herramientas diagnósticas es muy atractivo debido a lo económico del material y su fácil disponibilidad. Las matrices de papel son baratas y fácilmente disponibles con varios formatos o propiedades y la naturaleza porosa de su estructura es de esencial utilidad para los ensayos de flujo lateral. Con el uso de estas herramientas basadas en papel se puede realizar la determinación de distintos analitos en forma simultánea sin la necesidad de pipetas, jeringas, agujas, bombas o energía eléctrica. Estos dispositivos se basan en la creación de microcanales hidrofílicos en el papel creando un patrón de paredes de polímeros hidrofóbicos, photoresist o cera. Además, se pueden crear múltiples zonas de detección para distintos compuestos al depositar reactantes en la superficie del papel (enzimas o anticuerpos) a través de técnicas de biología molecular como ELISA. El mecanismo de migración de las muestras

líquidas dentro de los microcanales se basan en la capilaridad. Cuando la muestra alcanza la zona de detección se genera una reacción colorimétrica o electroquímica que puede ser medida.²⁰

Con la implementación de estos dispositivos de diagnóstico, la concentración del analito de interés se puede calcular de manera indirecta a través de la medición de la reflectancia del color generado en la zona de reacción. Esta reflectancia puede ser detectada tanto por un escáner comercial o una cámara digital para posteriormente ser medida a través de software especialmente diseñado para este tipo de ensayos, como el software ImageJ desarrollado por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los EEUU. Esta medición puede traducirse en una concentración del analito de interés a través de curvas de calibración que típicamente utilizan funciones no lineales del tipo $y = a \ln(bx)$. Se prefiere utilizar un escáner comercial antes que las cámaras digitales ya que tienen menor variabilidad en cuanto a distancia e iluminación en la toma de imágenes.¹⁹

1.2.3 TÉCNICAS DE ELISA

La técnica de ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) se fundamenta en la detección de un determinado antígeno a través de la creación de una reacción antígeno-anticuerpo o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas. Para lograr esta reacción, se requiere de la inmovilización del antígeno sobre una superficie sólida, lo cual se puede lograr con/sin el uso de un anticuerpo (con afinidad por el antígeno de interés) fijo a una superficie. Posteriormente el antígeno se expone a un anticuerpo conjugado con una enzima (frecuentemente fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano, esta última con un límite de detección más bajo) o fluoróforo que permita ser detectado o medido indirectamente con la incorporación de un sustrato o directamente, respectivamente. Por otro lado, los anticuerpos juegan un papel importante, pudiendo utilizarse tanto de origen monoclonal o policlonal. Los anticuerpos de origen monoclonal tienen la ventaja de ser más específico al unirse a un solo epítipo de la molécula estudiada, en comparación con los policlonales que se dirigen a múltiples epítopos y por lo tanto son susceptibles a presentar reactividad cruzada con otras moléculas.²¹ La medición obtenida es consecuencia de la presencia del antígeno en una muestra analizada. Existen al menos 4 tipos de ELISA: directo, indirecto, “sandwich” y

competitivo. En el ensayo de ELISA directo (el de interés para este proyecto) el antígeno es inmovilizado en la superficie (papel de nitrocelulosa) y posteriormente se expone a un anticuerpo conjugado a una enzima para permitir su medición a través de la reacción con un sustrato.²²

1.2.4 PARTICULARIDADES DE LA MEDICIÓN DE LA PTHio

La medición de la PTHio requiere de la determinación específica del fragmento de aminoácidos del 32-115 de la pre-pro PTH, es decir, del fragmento 1-84 de la PTH activa (también denominada PTH-intacta). De tal manera que los anticuerpos necesarios para el ensayo de ELISA deben de poseer afinidad por el fragmento 1-84 de la PTH para detectar la molécula intacta. Esto permite excluir dentro del ensayo, la detección de fragmentos biológicamente inactivos o inhibitorios de la misma hormona, como el fragmento 7-84 de la PTH.²³

A la fecha no existe ninguna tecnología basada en papel para la determinación de PTHio. El desarrollo de un dispositivo basado en papel para la determinación de esta hormona pudiera constituir una herramienta confiable, económica (materiales económicos, sin requerimientos de equipos de procesamiento costosos o especiales), de fácil distribución y uso.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

H₁.- Los resultados de la prueba rápida para la determinación de la PTHio en nitrocelulosa (denominada prueba experimental) tendrán una **CORRELACIÓN POSITIVA** igual o superior al 0.30 ó 30% a los valores de concentración de PTH sérica conocida determinada de manera preoperatoria con pruebas convencionales (calibrador para determinar la **EXACTITUD** de la prueba).

H₂.- Los resultados de la prueba experimental tendrán una **PRECISIÓN** del 90% (en términos de un coeficiente de variación que deberá ser menor al 0.10) a los determinados por prueba convencional para la medición de la PTHio en suero de pacientes operados por HPTP en este instituto en un periodo 6 meses.

H₃.- Los resultados de la prueba experimental tendrán una **CONCORDANCIA** en términos de un coeficiente de kappa igual o mayor al 0.60 mínimo esperado con relación a los valores determinados por la prueba convencional para la medición de PTHio (segundo método de EXACTITUD diagnóstica) en suero de pacientes operados por HPTP en este instituto en un periodo de 6 meses.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es el grado de exactitud y precisión diagnóstica para la medición de la PTHio entre la determinación por ELISA en papel/nitrocelulosa (prueba experimental) respecto a la medida por quimioluminiscencia (Access Intact PTH; Beckman Coulter®) que es el estándar de oro?

4. JUSTIFICACIÓN

La implementación de la medición de la PTHio durante la cirugía de los pacientes con HPTP toma un tiempo promedio de 30 minutos, lo cual tiene un impacto en los costos de la intervención quirúrgica. La obtención de una prueba en papel para la determinación de PTHio en pacientes con HPTP que posea un grado moderado de correlación matemática con el estándar de medición de dicha hormona y un grado aceptable de precisión y exactitud, podría reducir los costos relacionados con la atención de estos pacientes al acortar los tiempos de espera de la PTH con el paciente en sala y bajo anestesia.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS PRIMARIOS

5.1.1 Analizar el grado de **EXACTITUD** de los valores medidos por la prueba en papel de la PTHio (prueba experimental) con los valores de concentración de PTHio conocidos de los calibradores utilizados por la prueba de medición convencional (prueba rutinaria disponible en el INCMNSZ, quimioluminiscencia)

5.1.2 Investigar la **PRECISIÓN** de la prueba experimental con relación a la variabilidad de las mediciones de la PTHiO entre triplicados técnicos mediante el coeficiente de variación y ANOVA de una vía.

5.1.3 Investigar el grado de **VALIDEZ INTERNA** de la prueba experimental con relación a las mediciones de la PTHio entre triplicados técnicos y en relación con la prueba convencional utilizando el coeficiente kappa de Cohen, el coeficiente de correlación intraclass y la prueba de Bland-Altman.

5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

5.2.1 Comparar los tiempos para procesamiento de la PTHio entre la prueba experimental y el estándar de oro.

5.2.2 Comparar los costos del procesamiento entre la prueba experimental y el estándar de oro para la medición de la PTHio.

6. METODOLOGÍA

Este es un estudio de investigación básica con traducción clínica, cuasi experimental de post-prueba única con un alcance correlacional-analítico de eficiencia diagnóstico de una prueba clínica.

6.1 ESTRATEGIA (FASE) DEL ESTUDIO

6.1.1 ETAPA DE DISEÑO Y ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA

MATERIALES

Fase sólida:

Se utilizaron inicialmente 3 tipos de papel de nitrocelulosa distintos: a) papel de nitrocelulosa con poro de 22 nanómetros (nm) de BioRad, b) papel de nitrocelulosa con poro de 45 nm de BioRad, y c) papel de nitrocelulosa grado No. 1. Debido a mejores condiciones de absorción y manipulación del papel, se optó por el uso de papel filtro cualitativo de nitrocelulosa grado No. 1, con grosor de 180µm, porosidad 11µm (retención 98% de partículas) con peso base de 88g/m² y diámetro de 5.5 cm, de la marca Whatman™. La configuración de la superficie de reacción inicialmente fue de tipo rectangular migrando a un formato circular de 6 mm de diámetro. Esto debido a la dificultad para estandarizar la zona de interacción antígeno-anticuerpo y por lo tanto de medición a través del software ImageJ en el formato rectangular

del papel; a diferencia del formato circular que permite considerar la totalidad del área del papel como zona de interacción y medición (Figura 5).

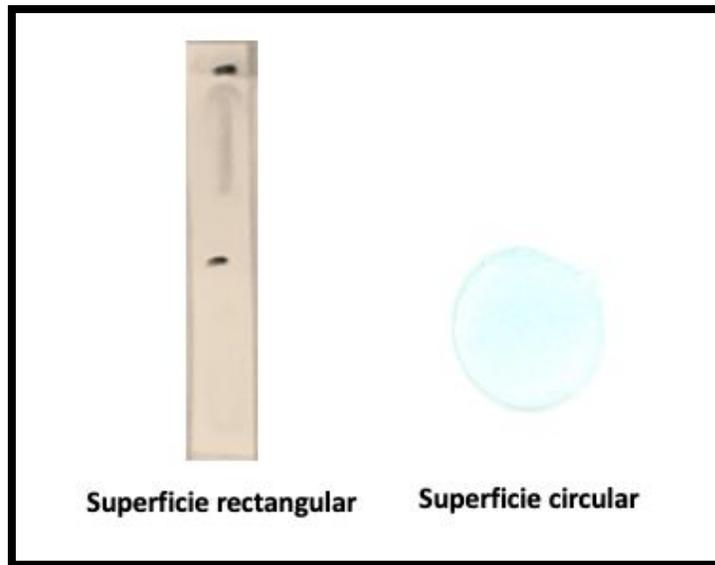


Figura 5. Superficies de interacción antígeno-anticuerpo y de medición.

Soluciones:

Para realizar el protocolo de la prueba experimental se utilizaron las siguientes soluciones:

- a) *Solución PBS 1x de Gibco, ThermoFisher Scientific.* Esta solución fue utilizada para la dilución del anticuerpo, la preparación de la solución de bloqueo y la preparación de la solución de lavado.
- b) *Solución de bloqueo:* La solución se preparó con base en BSA (Bovine Serum Albumin). Esta se preparó al 3%, utilizando 100mL de solución PBS 1x y 3 gramos de BSA marca Sigma-Aldrich, mezclada con un mezclador de vórtice y dividida posteriormente en tubos tipo Falcon de 50mL y refrigerada a 4 grados centígrados.
- c) *Solución de lavado:* Esta solución fue preparada con PBS 1x y Tween 20 nivel molecular de la marca Sigma-Aldrich. Esta preparación se realizó con 100mL de PBS 1x y 100 microL de Tween 20.
- d) *3,3',5,5'- Tetrametilbencidina:* Esta solución fue utilizada como sustrato de la enzima conjugada del anticuerpo contra PTH. La marca del producto fue Sigma-Aldrich.

Anticuerpo:

El anticuerpo utilizado para la reacción antígeno-anticuerpo fue: Anti-Parathyroid Hormone antibody ab154792 de la marca abcam. Este anticuerpo es de original monoclonal de tipo IgG obtenido de conejo y conjugado con la enzima peroxidasa de rábano con reactividad para la secuencia 32-115 de la PTH humana (PTH 1-84 o molécula intacta post-procesamiento, figura 6), comprobada a través de PTH humana recombinante y tejido de carcinoma de paratiroides en humanos, permitiendo selectividad por la molécula intacta activa. Después de múltiples ensayos a diferencias diluciones, se estandarizó la dilución 1 a 10,000. La solución del anticuerpo fue diluida con PBS 1X, como recomendado por el fabricante, y dividido en alícuotas que se utilizaron para cada uno de los ensayos, de tal forma que el mismo anticuerpo no se reutilizará para otro paciente, y fuera sometido a dos o más procesos de descongelación-congelación afectando la viabilidad o funcionalidad de este.

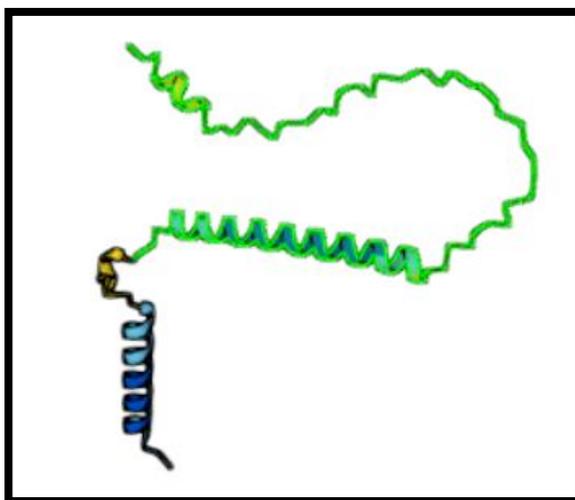


Figura 6. Estructura proteica de la PTH. En color verde se resalta el segmento de aminoácidos 32 a 115, que corresponden a la estructura de la molécula activa intacta (PTH 1-84), segmento que funge como epítipo al anticuerpo monoclonal de la prueba experimental.

Instrumental:

Una de las ventajas de la prueba desarrollada es la necesidad de instrumental escaso y de bajo costo. Dentro del material utilizado se incluye: el papel de nitrocelulosa Whatman no. 1, perforado de papel, micropipeta de laboratorio y puntas, pinza de disección fina para la manipulación de los discos, digitalizador de documentos, Scanjet N6350 de la compañía Hewlett-Packard, computadora personal y el software ImageJ.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Toma de la muestra: Las muestras fueron obtenidas en 4 tiempos: antes de la incisión cervical en el paciente, a los 5-, 10- y 30-min post-exéresis del tejido paratiroideo enfermo. Las muestras fueron tomadas de una vía periférica en la extremidad torácica contralateral a la vía de acceso venoso del paciente.

Volumen: Se tomaron 3mL de la muestra obtenida en cada uno de los tiempos antes mencionados con fines de procesamiento y evaluación por la prueba experimental.

Transporte: Todas las muestras fueron colocadas en tubos con EDTA y puestos en un recipiente con geles congelados y fueron entregadas después de su toma tanto en el laboratorio de nefrología (para la medición por prueba estándar), así como en el laboratorio de virología, lugar donde se realizó el procesamiento y mediciones por la prueba experimental.

Procesamiento: Una vez recibida la muestra en el recipiente con geles congelados, fueron inmediatamente centrifugadas a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4 grados centígrados para la separación de las fases de la muestra. La fase líquida (plasma) fue posteriormente distribuida en alícuotas de 100 microL en tubos eppendorf. Una de las alícuotas fue utilizada en el mismo tiempo para realizar la medición por la prueba experimental, el resto fue almacenado.

Almacenamiento: Las alícuotas obtenidas durante el procesamiento de las muestras fueron apropiadamente identificadas, colocadas en una caja para muestras bajo el nombre de **PTH_eP** y el mes de recolección de la muestra y colocadas en un ultracongelador a -70 grados centígrados en el laboratorio de virología en el octavo piso de la Unidad del Paciente Ambulatorio del INCMNSZ.

ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA

Fijación de la muestra:

Se colocaron 10 microL de la muestra sobre el disco de 6mm elaborado de papel Whatman No. 1 (fase sólida del ensayo) con técnica de goteo, asegurando que la totalidad de la superficie del disco fuera impregnada. La muestra se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. El resto de la muestra fue desechado siguiendo los lineamientos para material biológico.

Solución de bloqueo:

Posterior a la fijación de la muestra en papel, se administraron por goteo 10 microL de solución de bloqueo con técnica de goteo, dejando incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, esto con la finalidad de prevenir interacciones no específicas del anticuerpo sobre la superficie de la fase sólida.

Colocación de anticuerpo:

Se colocaron 5 microL de la solución con el anticuerpo contra PTH intacta a una dilución estandarizada de 1 a 10,000 sobre el disco de papel Whatman por técnica de goteo, dejándose incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. La alícuota del anticuerpo se utilizó para correr cada uno de los sets de 4 muestras de los pacientes, y desechado una vez el ensayo era terminado.

Lavado:

Posterior a los 10 minutos de incubación de la muestra-anticuerpo, cada disco de papel Whatman fue lavado con 10 microL de solución PBS 1x en dos ocasiones cada por técnica de goteo, una separada por un intervalo de tiempo de 3 minutos.

Reacción:

Posterior a los 2 eventos de lavado de cada disco, se incorporaron 5 microL de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) con técnica de goteo sobre cada uno de los discos de papel. La reacción colorimétrica tuvo una duración de 10 minutos con el objetivo de alcanzar la mayor actividad de la enzima conjugada y lograr el secado de cada uno de los discos.

Digitalización:

Los discos fueron colocados sobre la superficie de la cama de digitalización del equipo HP Scanjet N6350 de la compañía Hewlett-Packard®. La digitalización del set completo de muestras del paciente fue digitalizado a una resolución de 1200ppi y almacenado en formato JPG en un disco duro, con la apropiada identificación del caso para su posterior análisis.

Medición:

Cada una de las imágenes generadas posterior al proceso de digitalización fueron analizadas con el software ImageJ. Antes de las mediciones de reflectancia, todas las imágenes de manera estandarizada fueron contrastadas y se aplicó un filtro para la inversión de colores (Figura 7). La medición se realizó considerando la totalidad del disco digitalizado como área de procesamiento de la imagen. La información obtenida se incorporó a un archivo del software SPSS para su posterior análisis estadístico.

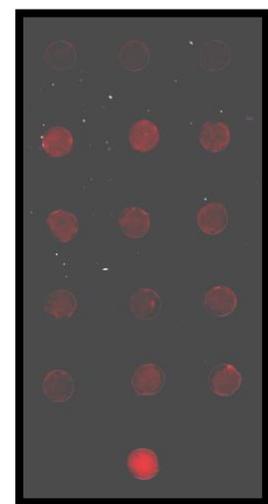


Figura 7.

6.1.2 ETAPA DE VALIDACIÓN

Al terminar, la elaboración de la curva de calibración, para la etapa de validación y evaluación de la exactitud de la prueba en papel, se planeó correr 82 muestras de pacientes con HPTP tratados quirúrgicamente en el INCMNSZ. El resultado obtenido de la medición de reflectancia por la aplicación ImageJ v.1.46r en la etapa previa se utilizaría para obtener de forma indirecta el valor de la PTHio sérica de los pacientes. El valor calculado con base a la curva de calibración se contrastaría con el valor medido por la prueba convencional. Como medición complementaria, se efectuaría un análisis para valorar si la disminución en 50% de los valores obtenidos por la medición de la reflectancia por ImageJ v.1.46r (prueba experimental) a los 10 minutos con relación al valor preincisional, podía predecir curación en el paciente, replicando los criterios de Miami (coeficiente de kappa y medidas de eficiencia diagnóstica).

6.1.3 ETAPA DE SEGUIMIENTO

Una vez finalizadas las mediciones, los pacientes cuyas muestras fueron utilizadas para el procesamiento por la prueba experimental, fueron evaluados en la consulta de cirugía endócrina de manera convencional con una cita en el postoperatorio mediato (1-2 semanas posterior al alta) y otra a los 6 meses del postoperatorio para evaluar el cumplimiento de criterio de curación, definidos por la presencia de valores normales de calcio sérico a los 6 meses de la intervención quirúrgica.

6.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Para efectuar la validación (segunda etapa) de esta prueba experimental (ensayos ELISA en papel para PTHio) se utilizaron, con previa autorización y consentimiento informado, las muestras obtenidas durante la paratiroidectomía de los pacientes que requirieron determinaciones de PTHio por prueba convencional. Estas muestras, usualmente consisten de 4 determinaciones por paciente, y se procesan por el laboratorio de Nefrología del INCMNSZ durante la intervención quirúrgica. De esta forma, no hubo necesidad de realizar alguna intervención adicional en los pacientes.

6.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes con diagnóstico confirmado de HPTP no familiar o esporádico a los que se les realice paratiroidectomía por el servicio de cirugía endócrina del INCMNSZ
2. Ambos géneros.
3. Pacientes adultos con edad mínima de 18 años y máxima de 99 años

6.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

1. Pacientes con otras formas de HPTP (como sindrómico o familiar) o secundario o terciario.
2. Pacientes cuyas muestras no sean útiles por defectos en la preservación o manejo.
3. Pacientes con datos o laboratorios incompletos
4. Pacientes que no otorguen su consentimiento para utilizar su muestra en el estudio.

6.2.3. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

1. Pacientes con muestra insuficiente para correr los triplicados técnicos.
2. Pacientes en cuya intervención quirúrgica se sospeche la presencia de enfermedad paratiroidea maligna o se confirme en el reporte de histopatología.
3. Pacientes que requirieron tratamiento concomitante de enfermedad tiroidea, ya que el resto del tejido paratiroideo es manipulado o potencialmente de-vascularizado, lo que puede afectar la secreción de PTH y por lo tanto las mediciones en el transoperatorio.

La selección muestral se realizó de forma sistemática no probabilística y por cuotas de las muestras previamente mencionadas.

6.3 TAMAÑO MUESTRAL

6.3.1 Cálculo para H1.- En este caso como se trata de un estudio con alcance correlacional, de tipo procedimental para una correlación de al menos el 30%, con muestreo no probabilístico sistemático y por cuotas. Con fines escolásticos y para conocer la probable potencia estadística de nuestro

estudio calculamos el tamaño muestral mediante el programa libre G*Power versión 3.1. 9.2 (©Franz Faul, Edgar Erdfelder, Albert-Geong Lang and Axel Buchner, 2006-2009). Se calculó con base en una correlación para dos muestras independientes a priori con un error alfa de 0.05 ó 5%, error beta del 20% (poder 80.33%) para una prueba de hipótesis de 2 colas y un efecto (r) de al menos +0.3 (con un coeficiente de determinación de 0.09) con un valor crítico de t de 1.99 se requiere de al menos un total de 82 ensayos con uso de calibradores.

6.3.2 Cálculo para H2.- Establecimos posteriormente el tamaño muestral con base al coeficiente de variación (precisión de la prueba) tomando en consideración un error alfa de 5%, un poder del 80%, un efecto f de 0.5 para dos determinaciones en el mismo suero, un valor crítico de F de 4.66 y una hipótesis de dos colas, obteniendo un tamaño muestral de 14. El cálculo del coeficiente de variación se realizó en la primera fase del proyecto, por lo que la n antes calculada está incluida en los 82 ensayos previamente calculados para establecer el grado de correlación. Se utilizó para este cálculo el programa libre G*Power versión 3.1. 9.2 (©Franz Faul, Edgar Erdfelder, Albert-Geong Lang and Axel Buchner, 2006-2009).

6.3.3 Cálculo para H3.- Para la segunda etapa del proyecto, realizamos el cálculo muestral para establecer la concordancia entre la prueba experimental y la convencional, a través del coeficiente kappa, obteniendo una n de 83 muestras tomando como referencia las siguientes variables: un coeficiente kappa de al menos 0.6, esperado de 0.9, un error beta de 20%, error alfa 5% para una hipótesis de dos colas. Para este cálculo utilizamos una calculadora libre en internet en un archivo de Excel desarrollado por el Dr. Wan Nor Arifin de la unidad de bioestadística y metodología de la investigación de la unidad de ciencias médicas de la Universidad Sains, Malasia.²⁴

Los cálculos muestrales se muestran en unidades de observación (número de muestras sanguíneas a ser utilizadas).

6.4. VARIABLES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.

6.4.1 VARIABLES DEPENDIENTES

GRADO DE CORRELACIÓN MATEMÁTICA ($r_{\text{Pearson}}/\rho_{\text{Spearman}}$): Esta variable se calculó durante la fase inicial del proyecto, tomando en cuenta la correlación existente entre los valores de PTH conocidos en los calibradores de la prueba convencional expresados en pg/ml y los valores obtenidos de reflectancia medidos por el software IMAGEJ a partir de la colorimetría arrojada por la prueba en papel.

PRECISIÓN: Representa el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el mismo proceso experimental de forma repetida, en este caso entre el ensayo inicial de PTH en papel y sus triplicados. Se calcula estableciendo el coeficiente de variación (CV). $CV(\%) = (\text{Desviación estándar}/\text{media}) * 100$.

EXACTITUD: La exactitud de la prueba hace referencia a la diferencia entre el promedio de las mediciones hechas con la prueba experimental y el valor obtenido por la prueba convencional (Kappa).

COSTO UNITARIO: Hace referencia al costo por muestra procesada. Se calculará exclusivamente con base al costo de los insumos necesarios para el procesamiento de las muestras en total dividido por el número de muestras procesadas. Este cálculo se realizó para ambas pruebas (experimental y convencional).

6.4.2 VARIABLES INDEPENDIENTES

REGISTRO: Corresponde al número identificador de la muestra a ser procesada. Esta es asignada por el sistema hospitalario al ingreso al INCMNSZ y corresponde a un valor numérico de 6 dígitos. A pesar de tratarse de un valor numérico, su tipo de escalamiento es nominal.

GÉNERO: Hace referencia al género del paciente del cual se extrajo la muestra a ser procesada. Su tipo de escalamiento es nominal y dicotómico (Hombre / Mujer).

EDAD: Hace referencia a la edad en años del paciente del cual se analiza la muestra. Su tipo de escalamiento es dimensional discreto.

TIEMPO PARA LA TOMA DE LA MUESTRA: Esta variable es de tipo ordinal y hace referencia al tiempo en el cual se tomo la muestra durante el periodo intraoperatorio, pudiendo tomar los valores de PRE-INCISIONAL, 5 MIN, 10 MIN y 30 MIN post-exéresis. Funge como segundo identificador de la muestra a ser procesada.

PTH CONVENCIONAL: Esta variable corresponde a la medición de PTH por prueba convencional realizada por el laboratorio de Nefrología del INCMNSZ expresada en pg/mL.

PTH PAPEL ELISA 1: Hace referencia al valor obtenido de reflectancia por el análisis de la imagen digitalizada del papel de nitrocelulosa (posterior a la prueba de ELISA para PTH) con el software IMAGEJ. El escalamiento de esta variable es dimensional continuo y puede tomar un valor entre 0 y 255.

PTH PAPEL TRIPLICADO: Hace referencia al valor obtenido de reflectancia por el análisis de la imagen digitalizada del papel de nitrocelulosa (posterior a la prueba de ELISA para PTH) con el software IMAGEJ. El escalamiento de esta variable es dimensional continuo y puede tomar un valor entre 0 y 255. Esta medición corresponde a la prueba por triplicado de cada muestra.

TIEMPO DE PROCESAMIENTO DE PTH EN PAPEL: Hace referencia al tiempo requerido para obtener el resultado por la prueba experimental, expresado en minutos. El periodo de tiempo comprende desde el inicio de fijado de la muestra en el papel, hasta la determinación indirecta de la PTH por la curva de calibración.

TIEMPO DE PROCESAMIENTO DE PTH CONVENCIONAL: Hace referencia al tiempo requerido para obtener el resultado por la prueba convencional, expresado en minutos. El periodo de tiempo comprende desde el inicio de procesamiento de la muestra en el laboratorio hasta la obtención del valor de PTH.

Para la etapa de diseño y estandarización de la prueba:

CONCENTRACION DE PTH EN EL CALIBRADOR: Esta variable corresponde a la concentración de PTH conocida de los calibradores utilizados en la prueba convencional en el INCMNSZ expresada en pg/mL.

CONCENTRACIÓN DE PTH EN PAPEL POR ELISA_1: Hace referencia al valor obtenido de reflectancia por el análisis de la imagen digitalizada del papel de nitrocelulosa (posterior a la prueba de ELISA para PTH) con el software IMAGEJ. El escalamiento de esta variable es dimensional continuo

6.5 IMPLICACIONES ÉTICAS

Este estudio se rigió por los principios éticos para la investigación médica en seres humanos de acuerdo con la Declaración de Helsinki y Lisboa así como de la Asamblea de la Asociación Médica Mundial y la American Medical Association, enmendada por la 59ª Asamblea General en Seúl, Corea, octubre 2008.

El suero por utilizar para realizar las pruebas de ELISA en papel será de muestras ex vivo, por lo que el paciente no fue sometido a ninguna intervención directa y por lo tanto los riesgos al mismo son nulos. Sin embargo, para cada muestra se solicitó el consentimiento informado (Anexo 1) de los pacientes durante el periodo preoperatorio para el almacenamiento y uso de estas en el presente proyecto de investigación.

Aun cuando las muestras de sangre para la determinación de la PTHio son parte del protocolo en la paratiroidectomía selectiva del INCMNSZ, toda la información y resultados obtenidos se des-identificaron mediante el uso del número de registro o expediente. Todos los datos se mantuvieron en bases de datos electrónicas que siguen las recomendaciones éticas para el uso de procesos electrónicos en medicina de la Asamblea de la Asociación Médica Mundial aprobada en octubre de 1978 en Múnich, Alemania y corregida en octubre de 1983 en Venecia, Italia. Toda la información se manejó y continuará manejándose en forma anónima al momento de presentarse o publicarse.

Este protocolo fue sometido y aprobado por el comité de ética institucional (INCMNSZ) (Anexo 2).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó análisis estadístico descriptivo utilizando medidas de tendencia central y dispersión adecuadas para el tipo de escalamiento y distribución de cada una de las variables analizadas. Para la identificación de variables con distribución paramétrica o no paramétrica se implementó la prueba de Kolmogorov-Smirnov de una muestra. De manera inferencial y para determinar el grado de correlación estadística entre ambas pruebas se consideraron las pruebas r_{Pearson} , ρ_{Spearman} y ANOVA, para concordancia el coeficiente kappa, así como el método de Bland-Altman, el coeficiente de correlación intraclase y el coeficiente de variación como medida de precisión; siempre considerando un valor de p (error alfa) estadísticamente significativo como igual o menor al 5% ó 0.05 para una prueba de hipótesis de 2 colas. La prueba de t de Student se consideró para realizar el análisis de los tiempos de cada una de las pruebas utilizadas para la medición de la PTH. De manera adicional se consideraron las medidas de eficiencia de una prueba diagnóstica para dictaminar curación a través de la prueba experimental, considerando para su cálculo una tabla de 2x2 construida a partir de las dos pruebas (experimental y convencional), en la que cada prueba categorizaba al paciente como tratado exitosamente de acuerdo con los criterios de Miami de manera independiente. Se incluyeron dentro de estas medidas de eficiencia diagnóstica: sensibilidad ($\frac{VP}{VP+FN}$), especificidad $\frac{VN}{VN+FP}$, valor predictivo positivo ($\frac{VP}{VP+FP}$), valor predictivo negativo $\frac{VN}{VN+FN}$ y exactitud

diagnóstica $\frac{VP+VN}{VP+FP+VN+FN}$. Para este análisis se utilizó el software estadístico IBM® SPSS® Statistics versión 20.0 (SPSS® Chicago, IL, USA), así como el programa Numbers® 09 versión 2.33 (554) para Macintosh® de Apple Inc para la representación gráfica de los resultados.

8. RESULTADOS

Vale la pena mencionar que la metodología descrita en el apartado 6.1.1 de este documento, corresponde también a los resultados obtenidos de este proyecto de investigación. Sin embargo, para facilitar la lectura de este manuscrito se ha decidido incorporar previo al apartado de resultados.

8.1 COHORTE DE LA FASE DE DISEÑO Y ESTANDARIZACIÓN

En la fase de diseño y estandarización se reclutaron un total de 21 pacientes con diagnóstico de hiperparatiroidismo primario de origen esporádico (no familiar o sindrómico). De estos 16 (76.2%) fueron del sexo femenino y 5 (23.8%) del sexo masculino. La mediana de edad fue de 57 años con un rango de 19 a 83 años. La totalidad de los pacientes cumplieron con el diagnóstico bioquímico de hiperparatiroidismo primario hipercalcémico (Tabla 2). La totalidad de los pacientes contaban con SPECT/CT con sestamibi como estudio preoperatorio de localización.

Variable bioquímica	N = 21
Cr Preoperatoria (mg/dL) - Mediana (IIC)	0.83 (0.55 - 1.08)
Calcio sérico preoperatorio (mg/dL) - Mediana (IIC)	11.63 (10.64 - 12.18)
Fósforo sérico preoperatorio (mg/dL) - Mediana (IIC)	2.51 (2.32 - 2.91)
PTH preoperatoria (pg/mL) - Mediana (IIC)	239.1 (107.4 - 511)
Calcio Urinario preoperatorio (mg/24 horas) - Mediana (IIC)	311 (150 - 443)
25-OH Vitamina D preoperatoria (ng/mL) - Mediana (IIC)	21.55 (16.6 - 27.9)

Tabla 2. Distribución de las variables bioquímicas de la cohorte de pacientes en la fase de diseño y estandarización (IIC= Intervalo intercuartilar).

Los criterios de Miami se cumplieron en 17 de 21 (80%) pacientes; los cuatro pacientes restantes requirieron de exploración cervical bilateral para la identificación de las 4 glándulas paratiroides, en 2 de estos se descartó enfermedad multiglandular, realizándose únicamente la paratiroidectomía selectiva de la glándula anormal y en 2 se identificó enfermedad multiglandular requiriendo de paratiroidectomía subtotal en uno de ellos y resección de doble adenoma paratiroideo en el otro. Al resto de los pacientes, tomando en cuenta que cumplieron con los criterios de Miami se les realizó paratiroidectomía selectiva del adenoma.

8.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE FASE DE DISEÑO Y ESTANDARIZACIÓN

Se obtuvieron 4 muestras sanguíneas de cada uno de los 21 pacientes incluidos en la primera fase del estudio, para un total de 84 muestras. Ochenta y dos muestras de estas 84 (97.6%) fueron útiles para procesamiento por ambas pruebas, 1 muestra de los 10 minutos post-excisión no llegó al laboratorio para el procedimiento experimental y 1 muestra arribó mal etiquetada al mismo laboratorio, por lo que fue imposible categorizarla. La mediana (RIQ) de las determinaciones de PTHio por la prueba estándar (quimioluminiscencia) fue la siguiente: preincisional 218.9 (131.5 – 592.9) pg/mL, 5' post-excisión 60.0 (29.7 - 129.5) pg/mL, 10' post-excisión 47.0 (23.6 – 94.7) pg/mL y 30' post-excisión 17.8(14.2 – 69.6) pg/mL; Figura 8.

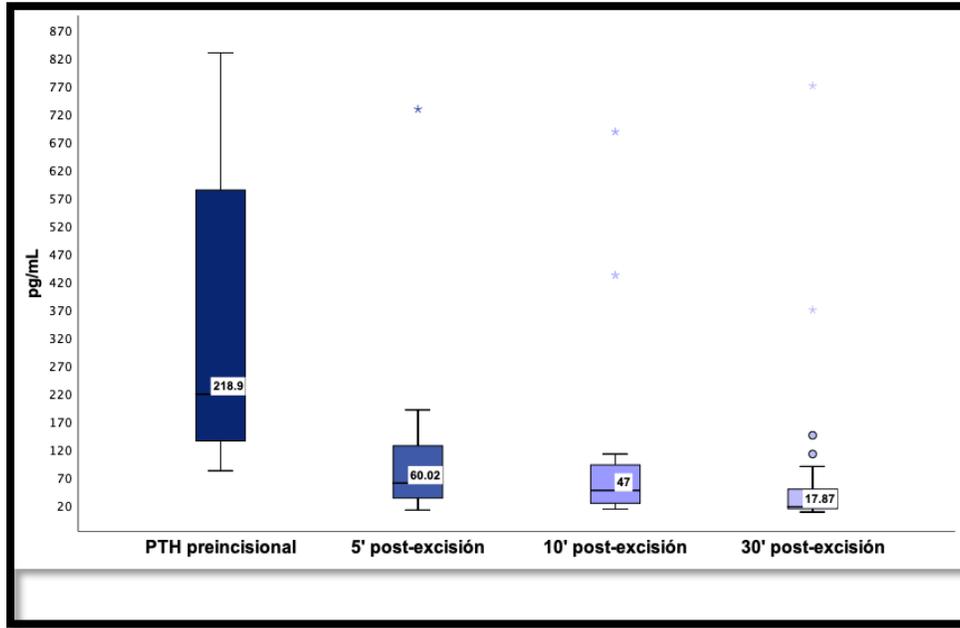


Figura 8. Gr3fica de cajas y bigotes con la representaci3n de la distribuci3n de las determinaciones de PTHio por prueba est3ndar, en los distintos tiempos de recolecci3n en pacientes de la fase inicial del proyecto.

8.2.1 PRUEBA EXPERIMENTAL

Las muestras recibidas fueron procesadas por la prueba experimental (ELISA en papel) por triplicado para cada tiempo de recolecci3n (Figura 9). Las medianas de medici3n en t3rminos de reflectancia de la prueba experimental fueron 85.5, 85.3, 87.6 y 90.7 para las muestras basales, 5-min, 10-min y 30-min post-exci3i3n, respectivamente. La mediana de variabilidad entre los triplicados t3cnicos de la prueba experimental fue de 0.03 (RIQ 0.02 – 0.07). La variabilidad entre triplicados t3cnicos de cada uno de los distintos tiempos de recolecci3n de las muestras se muestra en la Figura 10.

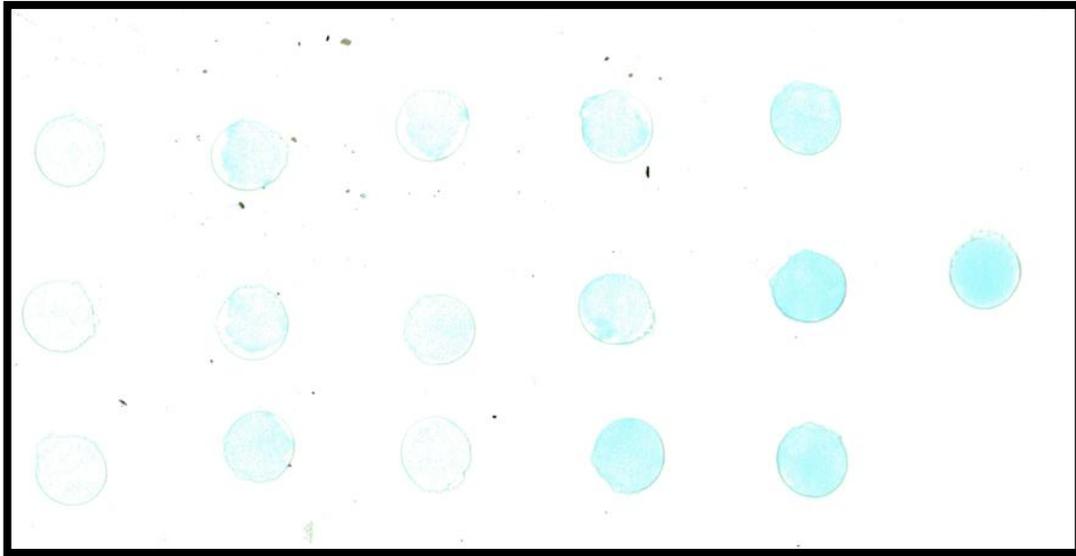


Figura 9. Prueba experimental por triplicada de un conjunto de muestras del mismo paciente, incluyendo control negativo y positivo.

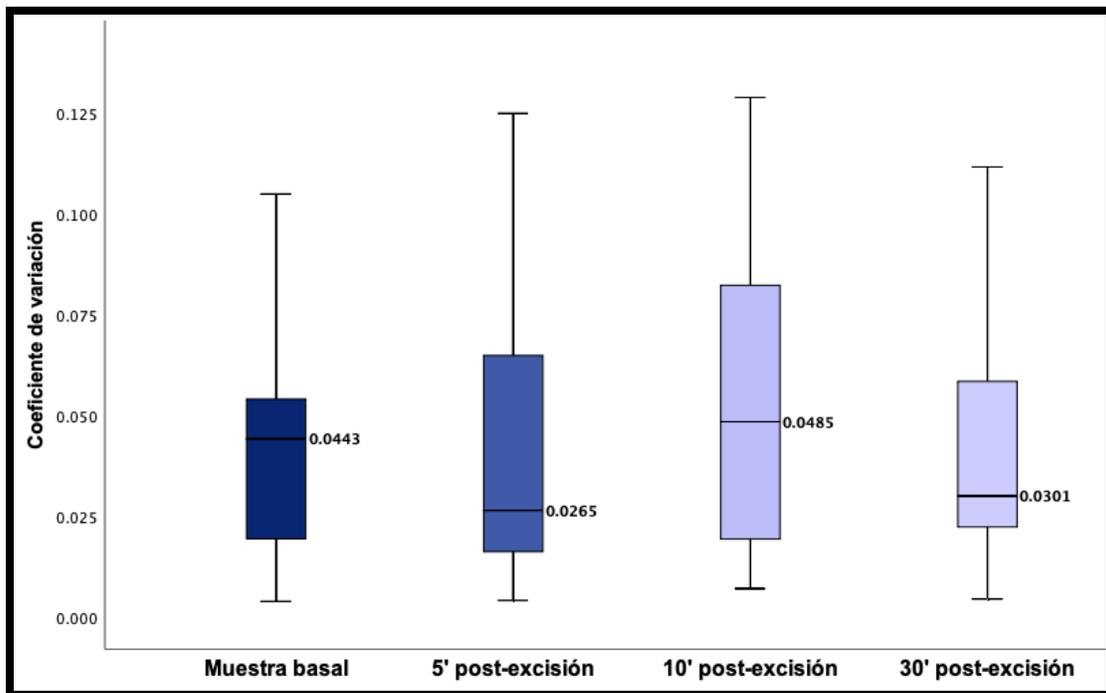


Figura 10. Coeficiente de variación (medianas e intervalo intercuartil) entre triplicados técnicos de la prueba experimental en cada uno de los tiempos de medición de la PTHio.

Una vez obtenidas las mediciones de reflectancia de cada una de las muestras de PTHio realizamos un análisis de correlación no paramétrico. Sin poder identificar una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de PTHio por la prueba estándar y la prueba experimental ($\rho_{\text{Spearman}} = 0.068$, $p = 0.33$). El dispersograma de la figura 11 muestra los datos obtenidos.

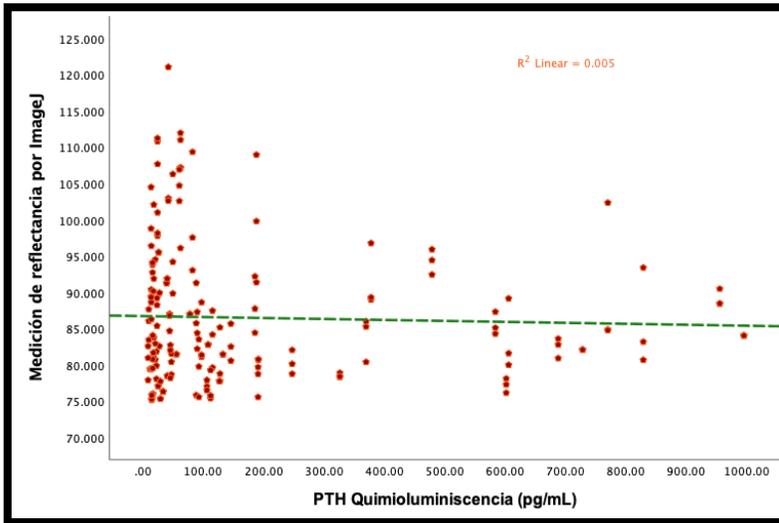


Figura 11. Dispersograma mostrando la relación entre los niveles de PTHio determinados por la prueba estándar y las mediciones de reflectancia de la prueba experimental.

Durante el análisis de las variables en el dispersograma, identificamos dos grupos de muestras que tienen a conglomerarse con un comportamiento distinto, por debajo y por arriba de los 100 pg/mL, como se muestran en la Figura 12.

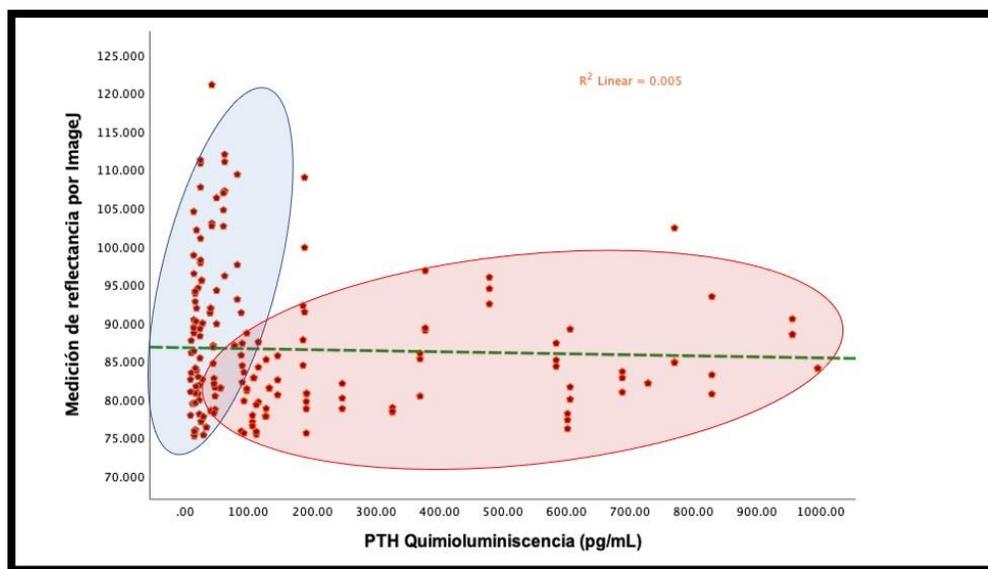


Figura 12. Dispersograma mostrando la relación entre los niveles de PTHio determinados por la prueba estándar y las mediciones de reflectancia de la prueba experimental, identificando los dos conglomerados de muestras con comportamiento distinto.

Se realizó análisis de correlación de estos dos conglomerados por separado, identificando que los pacientes con niveles de PTHio > 100 pg/mL tuvieron una correlación positiva moderada con las mediciones de reflectancia por la prueba experimental ($\rho_{\text{Spearman}} 0.291, p = 0.006$). Por el contrario, las concentraciones de PTHio < 100 pg/mL no tuvieron correlación alguna con dichas mediciones ($\rho_{\text{Spearman}} 0.163, p = 0.075$). En la figura 13 se muestra el dispersograma para estos dos conglomerados de muestras.

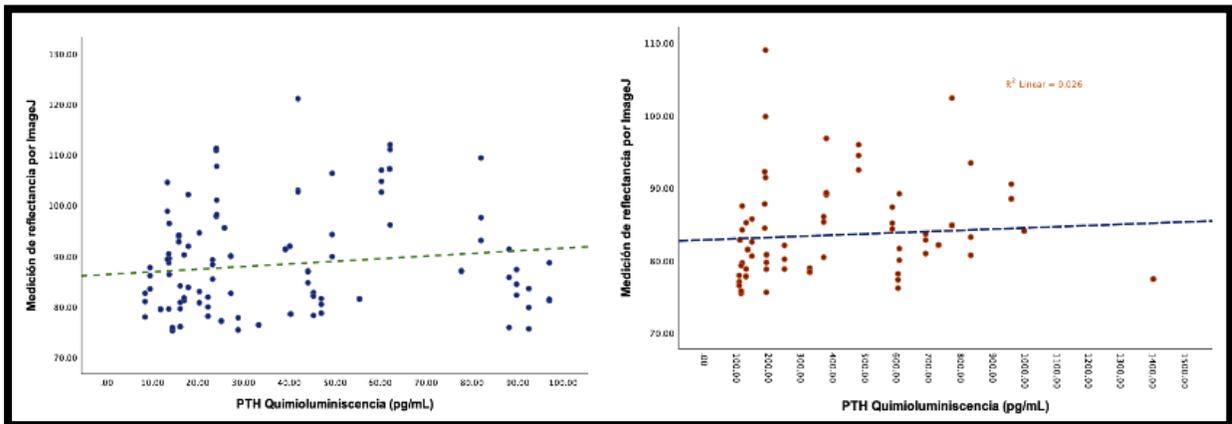


Figura 13. Dispersograma mostrando la relación entre los niveles de PTHio determinados por la prueba estándar y las mediciones de reflectancia de la prueba experimental, en muestras < 100pg/mL y > 100pg/mL, respectivamente.

8.3 PROBLEMAS IDENTIFICADOS

Durante el procesamiento de las muestras identificamos lecturas anormalmente elevadas en la reacción colorimétrica de aquellas muestras que se encontraban hemolizadas (figura 14). Teorizamos que esto es debido a la oxidación del sustrato utilizado durante la prueba experimental, lo que modifica las lecturas y sobreestima la verdadera concentración de PTH de la muestra en la medición.

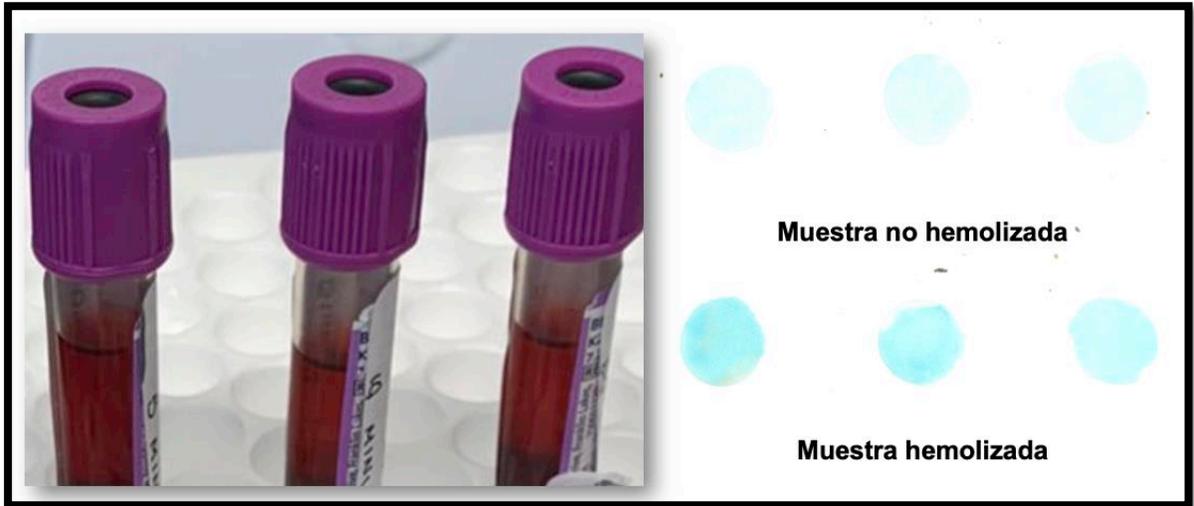


Figura 14. Muestras hemolizadas y su efecto en el procesamiento de las muestras a través de la prueba experimental.

Como segundo problema, identificamos durante el análisis de correlación entre las concentraciones de PTHio y las mediciones de reflectancia a través del software ImageJ un comportamiento distinto de aquellas muestras con concentraciones de PTH por la prueba estándar por debajo de los 100 pg/mL, lo que pudiera deberse a un problema de sensibilidad analítica del ensayo.

8.4 FASE DE SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES

De los 21 pacientes incluidos, 16 tuvieron valoración a los 6 meses de postoperatorio, corroborándose la presencia de normocalcemia (en calcio total o ionizado) como criterio de curación definitiva. Los 5 pacientes restantes no acudieron a la consulta de seguimiento, haciendo imposible evaluar el estado de normalización del calcio a los 6 meses. De estos 5 pacientes, 4 fueron intervenidos de paratiroidectomía selectiva y uno más de exploración cervical bilateral con resección de un doble adenoma.

9. DISCUSIÓN

Las determinaciones de la PTHio en los pacientes con HPTP juegan un papel importante no sólo al momento de establecer el diagnóstico de la enfermedad, si no también durante el procedimiento quirúrgico con fines de tomar decisiones en el transoperatorio e incrementar la probabilidad de un tratamiento quirúrgico exitoso. Estas mediciones “rápidas” requieren del uso de equipos de laboratorio no disponibles en todos los centros, no sólo de nuestro país sino en el resto del mundo.

La tendencia a nivel internacional, con base en principios de medicina global, es proveer a cada país de políticas, estrategias e instrumentos para mantener la salud de la población. Con tales fines, el diseño de instrumentos diagnósticos basado en papel ha tomado un auge en las últimas décadas, fomentado por la OMS. Estas técnicas de diagnóstico cumplen con las características esenciales para ser entregables y aplicables en lugares donde el acceso a la atención médica es complejo. A pesar de que México es un país considerado como de ingreso medio-alto y ser la segunda economía más grande de Latino-América, la cobertura y atención médica de la población no es completa, a pesar de ser un derecho universal. El desarrollo de estos instrumentos diagnósticos tiene una potencial aplicabilidad en nuestra sociedad.

A la fecha actual, no existe ningún estudio publicado en la literatura científica sobre la implementación de esta técnica para la medición de los niveles de PTHio con el cual poder contrastar nuestros resultados. Dentro de los trabajos publicados en la literatura científica, en 2010 y 2014 el grupo de Cheng y cols de Taiwán publicaron su experiencia para la determinación del antígeno (gp41) del Virus de la Inmunodeficiencia Humana en un ELISA con base en papel utilizando la técnica indirecta y de anticuerpo anti-NC16a en líquido de bullas de pacientes con pénfigo, respectivamente; mostrando una correlación positiva de grado moderado-alto con las concentraciones de estos anticuerpos medidos por pruebas convencionales.²⁵⁻²⁶ En 2018 el mismo grupo compartió su experiencia en relación con la medición de los niveles del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en líquido del humor acuoso, obteniendo sensibilidades de detección de 0.03 pg con un intervalo de detección de 0.01 a 100,000 pg/mL con la técnica de ELISA directa en papel.²⁷ Sin

embargo, en ninguna de sus publicaciones se comparte información con respecto a la precisión entre duplicados o triplicados de la prueba.

Las determinaciones en cuanto a reflectancia de nuestra prueba experimental mostraron una mediana en el coeficiente de variabilidad intra-ensayo de 3%, lo que de acuerdo con los estándares internacionales se considera aceptable si este se encuentra por debajo de 10%. Sin embargo, en nuestro análisis no identificamos una correlación significativa, en la totalidad de muestras estudiadas, entre los niveles de reflectancia obtenida por la prueba experimental y las mediciones de PTHio por la prueba convencional, evidenciándose un comportamiento distinto entre muestras conocidas con niveles menores y mayores a los 100 pg/mL, lo que creemos que es una limitación en cuanto a la sensibilidad analítica de la prueba experimental, al no poder detectar variaciones en las concentraciones de PTHio por debajo de los 100 pg/mL. Esta eventualidad, impidió pasar a la siguiente fase del estudio al no poder elaborar una curva de calibración para la fase de validación.

Con base en estos conceptos, la intención de este trabajo fue la creación, diseño y estandarización de una prueba de ELISA basada en papel para la determinación de niveles de PTH durante el transoperatorio de pacientes con HPTP, tendiendo en mente que su aplicabilidad pudiera extenderse para tamizaje de la enfermedad o confirmación de la presencia de tejido paratiroideo. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios desde el punto de vista de correlación de los ensayos experimental y estándar, impactando en la exactitud de las determinaciones y su utilidad clínica.

La decisión de utilizar la técnica de ELISA directo se justificó en seguir los principios ASSURED de la OMS, al ser un protocolo simple y rápido de efectuar, evitar errores en el procesamiento por la necesidad de pocos reactivos durante el proceso; y evitar la reactividad cruzada con técnicas que utilizan dos anticuerpos, como la técnica indirecta o “sándwich”. A pesar de estas ventajas, la técnica se caracteriza por tener baja amplificación de la reacción colorimétrica, lo que probablemente tuvo

un impacto en el problema de sensibilidad detectada en el instrumento de medición. Esto da pie, a continuar trabajando en variantes de la prueba en futuros proyectos.

10. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una de las principales limitantes del estudio fue la implementación de una técnica de ELISA directa, lo que creemos tuvo un impacto en los resultados de la prueba experimental. Esto llevó a resultados no concordantes con las mediciones realizadas por la prueba estándar desde la fase de diseño y estandarización de la prueba, lo que imposibilitó el llegar a la fase de validación y lograr los objetivos del estudio.

En cuanto al diseño metodológico, la aplicabilidad de la prueba de haber logrado la validación podría estar limitada a pacientes con hiperparatiroidismo primario, debido a que el grupo de estudio incluyó únicamente a este grupo de pacientes, siendo imposible establecer mediciones y conclusiones en otros grupos como en pacientes con hiperparatiroidismo secundario o terciario.

11. PERSPECTIVAS FUTURAS

Si bien los resultados de la prueba experimental no mostraron una correlación con los niveles de PTHio de los pacientes sometidos a intervención quirúrgica por HPTP, el proyecto abrió la posibilidad de trabajar en el rediseño de la prueba diagnóstica en conjunto con personal del CINVESTAV, teniendo como principales opciones la modificación de la prueba de ELISA directa por ELISA indirecta, lo que implicaría el uso adicional de otro anticuerpo, que por cuestiones de presupuesto y tiempo no fueron factibles en el desarrollo de este proyecto inicial.

12. CONCLUSIÓN

A través de la prueba experimental basada en la prueba de ELISA directa utilizando como fase sólida el papel de nitrocelulosa, las mediciones de reflectancia no tienen una correlación con los niveles de PTH determinados por quimioluminiscencia. El grado de correlación es distinto cuando se consideran los valores de PTH a partir de las concentraciones de la hormona por arriba o por debajo de los 100 pg/mL, lo que pudiera deberse a un problema de sensibilidad de la prueba experimental. Sin

embargo, la prueba experimental en nuestro trabajo tuvo una variabilidad del 3%, lo cual es aceptable de acuerdo con criterios analíticos internacionales.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Gasparri G. Updates in primary hyperparathyroidism. *Updates Surg* 2017;69: 217-223.
2. Walker MD, Silverberg SJ. Primary hyperparathyroidism. *Nature Reviews Endocrinology* 14(2).
3. Bilezikian JP, Cusano NE, Khan AA, Liu JM, Maricocci C, Bandeira F. Primary hyperparathyroidism. *Nat Rev Dis Primers* 2016;19:16033.
4. Bilezikian JP, Bandeira L, Khan A, Cusano NE: Hyperparathyroidism. *Lancet* 2018;391:168-178.
5. Lila AR, Sarathi V, Jagtap V, Bandgar T, Menon PS, Shah NS. Renal manifestations of primary hyperparathyroidism. *Indian J Endocrinol Metab* 2012;16:258-62.
6. Syed H, Khan A. Primary hyperparathyroidism: diagnosis and management in 2017. *Polish archives on internal medicine* 2017; 127(6).
7. Wilhelm SM, Wang TS, Ruan DT, Lee JA, Asa SL, Duh QY, Doherty GM, Herrera MF, Pasiaka JL, Perrier ND, Silverberg SJ, Solórzano CC, Sturgeon C, Tublin ME, Udelsman R, Carty SE (2016) The American association of endocrine surgeons guidelines for definitive management of primary hyperparathyroidism. *JAMA Surg* 151:959–968.
8. O'Neill SS, Gordon CJ, Guo R, Zhu H, McCudden CR. Multivariate analysis of clinical, demographic, and laboratory data for classification of disorders of calcium homeostasis. *Am J Clin Pathol* 2011;135(1):100-7.
9. Khundmiri SJ, Murray RD, Lederer E. PTH and Vitamin D. In: Terjung R, editor. *Comprehensive Physiology* [Internet]. 1st ed. Wiley; 2016 [cited 2023 Aug 7]. p. 561–601.
10. The UniProt Consortium, Bateman A, Martin MJ, Orchard S, Magrane M, Agivetova R, et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*. 2021 Jan 8;49(D1):D480–9.

11. Uldesman R, Akerstrom G, Biagini C, Duh QY, Miccoli P, Niederle B, Tonelli F. The surgical management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: proceedings of the fourth international workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99: 3595-3606.
12. Paek SH, Kim SJ, Choi JY, Lee KE. Clinical usefulness of intraoperative parathyroid hormone monitoring for primary hyperparathyroidism. *Ann Surg Treat Res* 2018;94(2):69-73.
13. Egan RJ, Scott-Coombes DM. The surgical management of sporadic primary hyperparathyroidism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2018;32(6):847-859.
14. Irvin GL 3rd, Solorzano CC, Carneiro DM. Quick intraoperative parathyroid hormone assay: surgical adjunct to allow limited parathyroidectomy, improve success rate, and predict outcome. *World J Surg* 2004;28(12):1287-92.
15. Barczynski M et al. Evaluation of Halle, Miami, Rome and Vienna intraoperative iPTH assay criteria in guiding minimally invasive parathyroidectomy. *Langenbecks Arch Surg* 2009;394(5):843-9.
16. Cayo AK et al. Utility of intraoperative PTH for primary hyperparathyroidism due to multigland disease. *Ann Surg Oncol* 2009;16(12):3450-4.
17. Insogna KL. Primary Hyperparathyroidism. *N Engl J Med*. 2018;379(11):1050-1059.
18. Guerin C, Paladino NC, Lowery A, Castinetti F, Taieb D, Sebag F. Persistent and recurrent hyperparathyroidism. *Updates Surg* 2017;69(2):161-169.
19. Martínez AW, Phillips ST, Whitesides GM, Carrilho E. Diagnostic for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Anal. Chem* 2010;82:3-10.
20. Costa MN, Veigas B, Jacob JM, Santos DS, Gomes J, Baptista PB, Martins R, Inácio J, Fortunato E. A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testins: lab-on-paper. *Nanotechnology* 2014 Mar 7;25(9):094006.

21. Lin AV. Direct ELISA. In: Hnasko R, editor. ELISA [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [cited 2023 Aug 7]. p. 61–7. (Methods in Molecular Biology; vol. 1318). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2742-5_6
22. Konstantinou GN. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol* 2017; 1592:79-94.
23. Cavalier E, Delanaye P, Nyssen L, Souberbielle JC. Problems with the PTH assays. *Ann Endocrinol (Paris)* 2015;76(2):128-33.
24. Donner A, Eliasziw M. A goodness-of-fit approach to inference procedures for the kappa statistic: Confidence interval construction, significance-testing and sample size estimation. *Statistics in medicine* 1992, 11, 1511-1519.
25. Cheng CM, Martinez AW, Gong J, Mace CR, Phillips ST, Carrilho E, et al. Paper-Based ELISA. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010 Jun 28;49(28):4771–4.
26. Hsu CK, Huang HY, Chen WR, Nishie W, Ujiie H, Natsuga K, et al. Paper-Based ELISA for the Detection of Autoimmune Antibodies in Body Fluid—The Case of Bullous Pemphigoid. *Anal Chem*. 2014 May 6;86(9):4605–10.
27. Tsao YT, Sung WH, Chen HC, Hsu MY, Cheng CM. Paper-Based ELISA: A Novel Diagnostic Approach for Monitoring Aqueous Humour VEGF Level in Ocular Diseases. In: Nowinska A, editor. *Novel Diagnostic Methods in Ophthalmology* [Internet]. IntechOpen; 2019 [cited 2023 Aug 8]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/novel-diagnostic-methods-in-ophthalmology/paper-based-elisa-a-novel-diagnostic-approach-for-monitoring-aqueous-humour-vegf-level-in-ocular-dis>

14. ANEXOS

ANEXOS



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

CIUDAD DE MÉXICO, A 17 DE NOVIEMBRE DE 2020
REG. CONBIOÉTICA-09-CEI-011-20160627
OFICIO No. MCONTROL-1469/2020

DR. MIGUEL F. HERRERA HERNANDEZ
INVESTIGADOR PRINCIPAL
DIRECCIÓN DE CIRUGIA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN
AV. VASCO DE QUIROGA No. 15
COL. BELISARIO DOMÍNGUEZ SECCIÓN XVI
DEL TLALPAN, C.P. 14080, CD. DE MÉXICO
P R E S E N T E

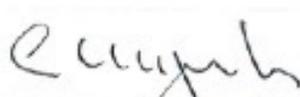
En respuesta a su oficio del pasado día 09 de noviembre, correspondiente al Protocolo de Investigación Clínica, titulado

"Diseño y elaboración de prueba ex vivo en papel de nitrocelulosa para la determinación de niveles séricos de hormona paratiroidea en pacientes con hiperparatiroidismo primario no familiar"
REF. 3028

Se toma conocimiento del estado actual del estudio, así mismo se autoriza la re-aprobación anual con vigencia hasta el 17 de noviembre de 2021.

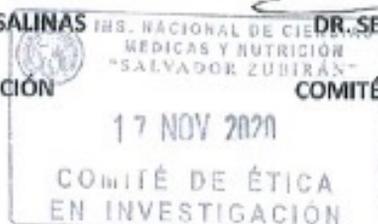
Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE,


DR. CARLOS A. AGUILAR SALINAS
PRESIDENTE
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN


DR. SERGIO HERNÁNDEZ JIMÉNEZ
SECRETARIO
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

CAAS/SHI/arv





CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO DE DISEÑO Y ELABORACIÓN DE PRUEBA *EX VIVO* EN PAPEL DE NITROCELULOSA PARA LA DETERMINACIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE HORMONA PARATIROIDEA EN PACIENTES CON HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO NO FAMILIAR (PTHeP)

- Investigador Principal:** Dr. David Velázquez Fernández
- Dirección:** Dirección de Cirugía. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Vasco de Quiroga #15. Colonia Sección XVI. Tlalpan C.P.14000. México D.F., México
- Teléfono de contacto:** Oficina de Cirugía INCMNSZ, lunes a domingo las 24hrs del día, tel. 58470900 ext. 2142 Investigadores, lunes a domingo las 24hrs del día, Teléfono 55 41913281
- Investigadores Asociados:** Dr. Rafael Humberto Pérez Soto
Dr. Miguel Francisco Herrera Hernández
- Comité de Ética:** Dr. Arturo Galindo Fraga, Presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ, teléfono: 54870900 ext. 6101

HOJA DE INFORME PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACION

Por este medio se le hace una cordial invitación a participar en el presente protocolo de investigación clínico sobre el diseño de un nuevo método de medición de hormona paratiroidea en sangre a través del uso de papel en pacientes operados de paratiroidectomía por hiperparatiroidismo primario esporádico de nuestro hospital.

Por favor tómesese todo el tiempo que sea necesario para leer este documento y pregunte al investigador sobre cualquier duda adicional que tenga. Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud, la Declaración de Helsinki, código de ética de la Asociación Mexicana de Cirugía General, A.C. y a las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

La paratiroidectomía (extirpación del tejido paratiroideo) es el único tratamiento curativo para pacientes con diagnóstico del hiperparatiroidismo primario y esta recomendada en presencia de síntomas o en aquellos casos donde los niveles de calcio o de hormona paratiroidea dañan tejidos tales como huesos y/o riñones. Este último daño a los tejidos puede verse reflejado como la presencia de osteoporosis, la formación de cálculos renales o el deterioro en la función del riñón. En la actualidad, la paratiroidectomía se realiza a través de una incisión que permite al cirujano acceder directamente a la glándula enferma en la mayoría de los casos, debido a que la principal causa de hiperparatiroidismo primario es la presencia de un tumor benigno de la glándula en un 85% de las ocasiones.

Este tipo de cirugía ha sido posible gracias al desarrollo de herramientas para el diagnóstico de la enfermedad y para la toma de decisiones durante la cirugía. Estas herramientas incluyen estudios de radiología para localizar la glándula paratiroides enferma y la medición de niveles de hormona paratiroidea durante la cirugía, antes y después de extirpar la glándula enferma. La medición de los niveles en sangre de la hormona paratiroidea durante la cirugía es posible debido a que la duración de la hormona en sangre es de aproximadamente 3-4 minutos. Esto permite predecir el éxito de la cirugía al documentar una disminución en los niveles de PTH en sangre después de retirado el tejido paratiroideo enfermo. La determinación de estos niveles de PTH toman un promedio de 30 minutos en procesarse.

El objetivo de este trabajo es diseñar una prueba para medir los niveles de PTH en sangre durante la cirugía que sea más económica, rápida y con el mismo grado de exactitud que la prueba convencional utilizada en nuestro Instituto.

Para decidir si participa voluntariamente o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los riesgos y beneficios que se describen adelante para participar en el proyecto con el fin tomar una decisión informada. Este consentimiento le dará información detallada acerca de nuestro proyecto de investigación y que podrá comentar con su médico tratante o con algún miembro del equipo de investigadores. Al final se le invitará a firmar este consentimiento informado para que forme parte del proyecto de manera anónima y voluntaria. Si desea no participar en nuestro proyecto, su tratamiento y manejo, así como el trato de sus médicos no se verá afectado.

INVITACIÓN A PARTICIPAR Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Estimado Sr.(a) _____

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) le invita cordialmente a participar en el proyecto titulado:

DISEÑO Y ELABORACIÓN DE PRUEBA *EX VIVO* EN PAPEL DE NITROCELULOSA PARA LA DETERMINACIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE HORMONA PARATIROIDEA EN PACIENTES CON HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO NO FAMILIAR (PTHeP)

Se trata de un estudio NO EXPERIMENTAL, el cuál consiste en que durante su cirugía (paratiroidectomía) después de extraídas las muestras de sangre antes de la incisión, a los 5, 10 y 30 minutos después de extirpado el tejido paratiroideo enfermo que rutinariamente se realizan en pacientes operados por hiperparatiroidismo primario, se utilice un volumen de cada una de sus muestras para realizar una medición de los niveles de PTH a través de un método nuevo basado en papel. Estas muestras se utilizarán de forma exclusiva para tal fin, y no se emplearán para realizar mediciones de alguna otra sustancia o para otros protocolos de investigación. El análisis de las muestras, así como la información personal obtenida de cada paciente será ingresada a una base de datos de forma anónima y confidencial para su posterior análisis.

Si usted decide participar voluntariamente en nuestro estudio y firma el presente consentimiento informado, usted nos está autorizando a:

1. Utilizar un volumen de sangre del previamente extraída en quirófano para la medición de la hormona paratiroidea por el método convencional.

2. Incluir sus datos personales, clínicos, bioquímico, patológicos y quirúrgicos en una base de datos para el análisis posterior. Reiteramos que todos estos datos serán ingresados en una base de datos de forma anónima y confidencial. La presentación de los resultados de este proyecto sólo se llevará a cabo en instancias médicas y científicas con interés académico. No habrá ningún tipo de difusión pública de estos datos.

De igual manera cabe recalcar que la utilización del volumen de sangre necesario para realizar la determinación de la PTH por el nuevo método no modificará de ninguna manera el curso convencional de su tratamiento quirúrgico ni el seguimiento postoperatorio que de manera rutinaria se hace en pacientes como usted. La medición de la PTH por este nuevo método no agrega ningún costo adicional a su procedimiento quirúrgico. Tampoco ningún examen de laboratorio o imagen adicional se solicitará por motivo de este proyecto.

La medición de la PTH por el nuevo método NO tiene ningún riesgo para su cirugía ni los resultados de la misma. La sangre necesaria para la medición de la PTH se obtendrá directamente de la muestra previamente extraída con fines de medir PTH por el método convencional, tal y como se realiza de manera rutinaria en casos de hiperparatiroidismo primario en nuestro Instituto. No se requiere de contacto alguno adicional con el paciente, ni pone en riesgo las condiciones asépticas del campo quirúrgico.

No hay beneficios directos ni inmediatos para usted en este proyecto. Sin embargo, su participación ayudará a pacientes futuros con padecimientos similares al de usted. Si resulta de utilidad este método, podremos realizar mediciones de PTH durante la cirugía con un método sencillo, más rápido y económico al utilizado en la actualidad.

Su participación en este proyecto no tendrá ningún costo adicional a su tratamiento primario, pero tampoco condicionará ningún tipo de remuneración económica ni en especie.

Su participación es completamente VOLUNTARIA y ANÓNIMA. Si usted decide no participar, no se afectará su relación con su médico primario tratante, cirujano, con el INCMNSZ o su derecho para recibir atención médica o cualquier servicio al que tenga derecho. Si decide participar, tiene también la libertad para retirarse del proyecto en cualquier momento.

Su nombre no será usado en ningún estudio, resultado, análisis o publicación del proyecto. La inclusión de sus datos clínicos no contendrá ninguna información personal y se codificará con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación de su persona ulteriormente. Los códigos que identifican su participación estarán sólo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por Ley (conforme a lo descrito en la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares; DOF 05-07-2010 particularmente en los primeros 3 capítulos) a no divulgar su identidad ni información personal sensible de maneja pública. La confidencialidad y privacidad de sus datos será protegida como lo marca esta misma ley.

En caso de que usted tenga alguna duda sobre el estudio, por favor póngase en contacto con el investigador principal o con cualesquiera de los investigadores asociados a los teléfonos arriba mencionados en un horario de oficinas conveniente.

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

- Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.
- Estoy de acuerdo en que el manejo de mi información se apegue a la normatividad internacional sobre la investigación clínica en humanos, así como la Ley Federal de Protección de Datos personales en posesión de particulares
- Estoy de acuerdo en que mi información personal, médica y quirúrgica sea anónima y desidentificada así como que pueda ser incluida en el Registro Estadístico Mexicano de Calidad y Resultado en Cirugía General así como en un futura pueda ser utilizada con fines de calidad e investigación académica.

Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado. Por favor responda las siguientes preguntas:

	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
a. ¿Ha leído y entendido la forma de consentimiento informado en su lenguaje materno?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. ¿Entiende usted que su participación es anónima, voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g. ¿Entiende los posibles riesgos mínimos de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h. ¿Entiende que no recibirá algún beneficio directo de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
i. ¿Le queda claro que el participar en este estudio no modifica en ninguna forma su tratamiento médico ni quirúrgico ni el de su enfermedad así como el conocimiento de que no le va a otorgar ningún beneficio económico su participación en el mismo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
j. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
estudio de investigación?		
k. ¿Entiende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que Usted no siguió los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento, para sus registros personales?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Declaración del Paciente

Yo, _____
declaro que es mi decisión participar voluntariamente en el presente estudio. Mi participación será anónima y mantendrá mis datos personales bajo el resguardo de mi médico tratante, así como del INCMNSZ en todo momento. He sido informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios como paciente. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho por parte del INCMNSZ o médico primario tratante y no sufriré ningún tipo de perjuicio en mi atención médica o en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en el estudio. Si tengo alguna pregunta adicional podré ponerme en contacto con los investigadores responsables del presente protocolo.

He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el registro. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción.

Tengo claro que en caso de tener preguntas sobre mis derechos como sujeto de investigación clínica en este estudio, problemas, preocupaciones o dudas, y deseo obtener información adicional, o bien, hacer comentarios sobre el desarrollo del estudio, tengo la libertad de hablar con el presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Arturo Galindo Fraga, tel: 54870900. ext. 6101).

_____ Nombre del Participante	_____ Firma del Participante	_____ Fecha
_____ Nombre del Representante Legal	_____ Firma del Representante Legal	_____ Fecha
_____ Nombre del Investigador	_____ Firma del Investigador	_____ Fecha
_____ Nombre del Testigo 1	_____ Firma del Testigo 1	_____ Fecha
_____ Nombre del Testigo 2	_____ Firma del Testigo 2	_____ Fecha

Lugar: _____

Fecha: _____