

GUÍAS DE ESTUDIO DE TRABAJOS PRÁCTICOS, QUÍMICA CLÍNICA

Graciela Noemí Malvasi
Araceli Beatriz Servian
Graciela Viviana Dusse
María Mercedes Formichela
Elba Cristina Malarczuk
Ivana Magali Medina

Colección: Cuadernos de Cátedra



Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales

EDITORIAL UNIVERSITARIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

Coronel José Félix Bogado 2160
Tel-Fax: 03764-428601

Correos electrónicos:
direccion@editorial.unam.edu.ar
Página WEB: www.editorial.unam.edu.ar

Colección: Cuadernos de Cátedra
Coordinación de la edición: Nélide González
Preparación para la web: Francisco A. Sánchez

Guía de estudio de trabajos prácticos : Química clínica /
Graciela Noemí Malvasi ... [et al.]. - 1a ed.-
Posadas : Universidad Nacional de Misiones.
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, 2019.
Libro digital, PDF - (Cuadernos de cátedra)

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-950-766-147-1

1. Proteínas. 2. Hiperglucemia. 3. Diabetes. I. Malvasi,
Graciela Noemí.
CDD 572

ISBN: 978-950-766-147-1
Impreso en Argentina
©Editorial Universitaria
Universidad Nacional de Misiones
Posadas, 2019

I
PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

CUERPO DOCENTE

JTP Malvasi, Graciela Noemi

JTP Dusse Graciela Viviana.

Auxiliar 1ra Formichela Maria Mercedes.

Auxiliar Egresada Ad-Honoren Medina Magali Ivana

Auxiliar Alumna Ad-Honoren Servian Araceli Beatriz.

Prof. Adj. Galeano Zulema.

Prof. Adj. Malarczuk Elba Cristina.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas están presentes en todas las células y en los distintos líquidos corporales: suero o plasma (6 - 8 g/dl)*, orina (Menor a 150 mg/24hs)*, LCR (15 - 45 mg/dl)* y demás líquidos Biológicos (Pleural, Ascítico). (*) Valores de referencia para adultos.

Las *proteínas plasmáticas* (PP) son todas aquellas proteínas que se encuentran en el plasma. Se las puede clasificar en base a diferentes criterios, así:

a. Según el *lugar donde cumplen su función*:

- *Proteínas plasmó-específicas*: componentes habituales del plasma, entre ellas albúminas y globulinas. El principal lugar de síntesis es el hepatocito (albumina, alfa y beta globulinas), mientras que las gamma globulinas son sintetizadas por las células plasmáticas.
- *Proteínas no plasmó-específicas*: aquellas que aparecen en el plasma tras la liberación desde otras células. Ej: Fosfatasa alcalina, Creatinfosfoquinasa, entre otras.

b. Según su *función* propiamente dicha:

- *Proteínas del mantenimiento de la presión oncótica* (Albumina, otras)
- *Proteínas de transporte* (Apolipoproteínas, Transferrina, otras)
- *Proteínas asociados a sistemas buffer* (todas las PP)
- *Proteínas con acción enzimática* (Sistema de la coagulación y Fibrinólisis, Inhibidores de proteasas, otras)
- *Proteínas reactantes de fase aguda* (PCR: Proteína C Reactiva; otras)
- *Proteínas del sistema inmune* (Inmunoglobulinas; Complemento, otras)

c. Según la *movilidad electroforética* (en soporte acetato de celulosa o gel de agarosa), se separa a las proteínas en diferentes *fracciones o bandas*:

Tabla N°1: Fracciones o bandas del Proteinograma

Fracciones	Componente de mayor concentración
<i>Prealbúmina - Albúmina</i>	<i>Albumina</i>
<i>α1-Glob (Alfa 1- Globulinas)</i>	<i>α1-Antitripsina</i>
<i>α2-Glob (Alfa 2- Globulinas)</i>	<i>α2-macroglobulina Haptoglona</i>
<i>β1-Glob (Beta 1 Globulina)</i>	<i>Transferrina</i>
<i>β2-Glob (Beta 2- Globulina)</i>	<i>Componentes del complemento C3</i>
<i>γ- Glob (Gama-Globulina)</i>	<i>IgG, IgA e IgM</i>

Las *determinaciones de Laboratorio en el estudio de las PP*, que se utilizan para *diagnóstico y seguimiento* de diversas situaciones clínicas, son:

- I. Proteinemia: Cuantificación de Proteínas totales en sangre
- II. Albuminemia: Cuantificación de Albúmina en sangre
- III. Proteinograma (PTGR): Valoración de las diferentes fracciones proteicas
- IV. Identificación de Inmunoglobulinas (Igs)
- V. Cuantificación de PP

Los *resultados de dichas determinaciones* proporcionan información relacionada a:

- Estado nutricional
- Capacidad de síntesis del hígado
- Función renal (filtración y reabsorción)
- Procesos inflamatorios agudos y crónicos
- Enfermedades del sistema inmunológico: enfermedades autoinmunes e inmunodeficiencias
- Errores metabólicos
- Procesos Hemolíticos
- Oncohematologías: Gammapatías Monoclonales, otras.

LABORATORIO

El estudio de las PP abarca las determinaciones descritas anteriormente, que generalmente, son *determinaciones programadas*. Se puede iniciar con:

- Proteinemia y PTGR (de éste último se obtiene el valor de la Albuminemia).
- Proteinemia, Albuminemia, y posteriormente el Proteinograma.

En *situaciones de urgencias* se solicita Proteinemia/Albuminemia.

Además, las determinaciones de Proteinemia y Albuminemia, pueden estar incluidas en el Hepatograma.

El *Algoritmo Diagnóstico* a seguir dependerá del *cuadro clínico* que presente el paciente y del *patrón electroforético* que muestre el PTGR de la muestra en estudio. En base al mismo, se procederá a *identificar y/o cuantificar* la proteína específica.

ETAPA PREANALÍTICA

Las *instrucciones* que debe cumplimentar el paciente para la toma de muestra, para la realización de los estudios de PP, deben ser explicadas en forma verbal y entregadas en formato escrito (redactadas en lenguaje claro y sencillo) por el profesional bioquímico.

- *Estudios programados*: concurrir al laboratorio en Condiciones Basales*, entre las 7 y las 9 horas.

*Condiciones Basales: Ayuno de 8hs y post-descanso nocturno, no realizar ninguna actividad física (Ej: ir al banco y/o hacer compras)

- *Estudios de urgencias*: las condiciones son las que presenta el individuo al momento de la extracción sanguínea (generalmente no se cumplen las condiciones basales).

La *muestra biológica* para los estudios de PP es *Suero*. **

**Observación: en caso de utilizar plasma, en el Proteinograma, se observará la banda correspondiente al fibrinógeno.

ETAPA ANALÍTICA

DESCRIPCIÓN DE LAS DETERMINACIONES DE LABORATORIO

Tabla N°2: Determinaciones de Laboratorio en el estudio de Proteínas Plasmáticas y metodologías disponibles.

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	FUNDAMENTO/MÉTODO	INFORMACIÓN
I. Proteinemia	Reacción del Biuret	Concentración de Proteínas totales en sangre
II. Albuminemia	Fijación de colorante Fraccionamiento electroforético Formación de inmunocomplejo	Concentración de Albúmina en sangre
III. Proteinograma (Separación y análisis de proteínas por Electroforesis)	<u>Electroforesis convencional</u> Electroforesis de zona <u>Electroforesis automatizada</u> Electroforesis Capilar	Fracciones proteicas: Concentración de Albúmina y Globulinas ($\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2, \gamma$)
IV. Identificación de Inmunoglobulinas	Inmunoelectroforesis Inmunofijación	Identificación del componente monoclonal
V. Cuantificación de proteínas	Inmunodifusión radial Turbidimetría Nefelometría Freelite - Inmunodiagnóstico	Concentración de: Inmunoglobulinas(GAM) Transferrina Haptoglobina Otras

I. PROTEINEMIA

Existen diversos métodos para la cuantificación de proteínas, pueden ser *físicos o químicos*.

Entre los métodos químicos se encuentra la reacción de Kjeldahl, que es el método de referencia para la determinación de nitrógeno orgánico, fundamentalmente de origen proteico; pero presenta el inconveniente de que además cuantifica nitrógeno de fuentes no proteicas (como el que deriva de la urea y el ácido úrico). Es por ello que, para el dosaje de proteínas en el área de química clínica se utilizan otros *métodos químicos*, como la reacción del Biuret, el Método de Lowry, la fijación a colorantes o la precipitación con ácido TCA o Sulfosalicílico

La elección del método-según fundamento- depende de la concentración proteica en la muestra en estudio.

La **reacción de Biuret** por su sensibilidad, se utiliza para cuantificar concentraciones proteicas altas (>200 mg/dl), como las que están presentes en las muestras de suero, plasma, y líquidos Biológicos (Pleural, Ascítico).

Los **métodos turbidimétricos** por su sensibilidad, se utilizan para valorar concentraciones proteicas bajas (5 - 150 mg/dl), como las que se encuentran en orina o LCR, y se basan en la adición de ácido tricloroacético (TCA) o ácido sulfosalicílico que permite la formación de un precipitado cuya turbidez puede medirse.

MÉTODO COLORIMÉTRICO DE PUNTO FINAL: REACCIÓN DEL BIURET

Puede realizarse, con metodología Manual o Automatizada (Lectura Bicromática)

Fundamento: Los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales (PT) en la muestra.



II. ALBUMINEMIA

La albúmina es el principal contribuyente de las proteínas totales plasmáticas.

El método más utilizado para su cuantificación se basa en la unión de la albúmina a colorantes o indicadores, siendo el más común el que utiliza verde de bromocresol.

Otra forma, es la cuantificación por fraccionamiento electroforético, donde el valor de Albuminemia se obtiene por cálculo a partir de la electroforesis de proteínas, así:

$$[ALB] = \%ALB \times [PT] / 100\%$$

Donde:

[ALB]: Albuminemia

%ALB: % de Albúmina (banda del PTGR)

[PT]: Proteinemia

Sin embargo los métodos más específicos disponibles en la actualidad son inmunológicos, donde se forman complejos específicos albúmina-anticuerpos que se miden por turbidimetría y nefelometría.

MÉTODO COLORIMÉTRICO DE PUNTO FINAL: *FIJACIÓN DE COLORANTES*

Puede realizarse con metodología manual o automatizada.

Fundamento: La albúmina reacciona específicamente (sin separación previa) con la forma aniónica de la 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfonftaleína (BCF), en presencia de un exceso de colorantes, en medio tamponado a pH ácido. El aumento de absorbancia a 625 nm respecto del Blanco de reactivo, es proporcional a la cantidad de albúmina presente en la muestra.

III. PROTEINOGRAMA: SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS

La electroforesis (EF) de PP, generalmente solicitada como *Proteinograma*, es una técnica que permite la separación y posterior cuantificación de las diferentes fracciones proteicas.

Fundamento: Mediante la aplicación de un campo eléctrico las partículas cargadas negativamente (*anión*) migran hacia el polo positivo (ánodo), mientras que, las cargadas positivamente (*cación*) migran hacia el electrodo negativo (cátodo). Los factores que influyen en la movilidad electroforética son:

1. Parámetros externos:

- *Campo eléctrico:* determinado por la diferencia de potencial, la Resistencia y la Intensidad de corriente.
- *Temperatura:* debe controlarse de manera estricta para que no se desnaturalicen los componentes del suero.

2. Parámetros relacionados al solvente y al sistema electroforético:

- *Fuerza iónica (u)* del buffer: representa la concentración de iones que hay en el mismo y es importante, porque cuando es baja, permite velocidades de migración de los solutos más rápidas y con menor desprendimiento de calor.
- *pH del sistema:* determinado por el *tampón o buffer*, lo que a su vez determina la carga eléctrica de las partículas.
- *Tipo de soporte:* Según el tipo será *fraccionamiento por carga y/o peso molecular*

3. Parámetros relacionados con la muestra: constituida por proteínas de diferente tamaño, forma y carga eléctrica.

Las proteínas son sustancias anfóteras y dependiendo del medio en el que estén se comportan como ácidos (ceden protones y quedan con carga negativa) o bases (captan protones y quedan con carga positiva), lo que permite la separación de las distintas fracciones proteicas. El pH al que un aminoácido (aac), no se comporta ni como ácido ni como base se denomina punto isoeléctrico (PI), en estas condiciones la estructura del mismo no posee carga neta. Los PI varían desde 3 a 10, sin que exista un pH al que todos los aac. sean neutros.

- A pH superior 2 o + unidades a PI, el aac. aparece cargado negativamente
- A pH inferior 2 o + unidades a PI el aac. aparece cargado positivamente
- A pH = PI los aac. aparecen como iones dipolares neutros.

En soluciones muy ácidas todos los aac. aparecen como cationes (carga positiva), mientras que en soluciones muy básicas los aac. se encuentran en forma aniónica (carga negativa).

Así, la carga neta en la molécula es variable y depende del pH del buffer; si el mismo es menor que el PI, las proteínas se comportan como cationes y, si es superior al PI, se comportan como aniones **“la carga de la proteína se hace más negativa a medida que el pH del buffer se hace más básico”**.

De este modo, a pH 8,6 (básico) todas las proteínas migran hacia el ánodo (tienen carga neta negativa) y así la albúmina, con PI de 4,7 tendrá una mayor carga negativa que la fracción de gamma-globulinas, que tiene un PI de 7,2.; lo que explica que la albúmina recorra una mayor distancia que la gamma-globulina cuando se sitúen en un campo eléctrico.

TIPOS DE ELECTROFORESIS

Existen tres tipos de electroforesis (EF): *EF de frente móvil o libre*, *EF de zona (metodología convencional - manual)* y *EF capilar*:

1. **EF de frente móvil o libre:** los componentes de la muestra están presentes en toda la disolución y las partículas se mueven de forma libre en el medio en que se encuentran dispersas. Actualmente en desuso.
2. **EF de zona: Metodología convencional - manual:** es la más utilizada. La muestra se aplica como una banda sobre un soporte sólido inerte y sus componentes migran a través de un disolvente. Los soportes que pueden utilizarse son: papel, acetato de celulosa o gel (agarosa, poliacrilamida, entre otros).
3. **EF capilar:** tiene la ventaja de que permite la *automatización*. Se realiza en capilares de sílice fundido. Existen varias modalidades de EF capilar, entre ellas, la *EF capilar de zona*, *Cromatografía micelar electrocinética*, *EF capilar en gel*, *Isoelectroenfoque capilar*, *Enfoque isoeléctrico* e *Isotacoforesis capilar*.

METODOLOGÍA CONVENCIONAL – MANUAL: EF DE ZONA

En la EF con metodología manual, o también llamada convencional, se pueden utilizar distintos **tipos de soporte sólido**: papel de filtro, acetato de celulosa y geles (de agarosa, de poliacrilamida, SDS-PAGE). A continuación se describen cada uno de ellos.

- 1) **PAPEL DE FILTRO**: actualmente en desuso debido al *efecto electroendosmótico*.
- 2) **ACETATO DE CELULOSA (cellogel)**: es uno de los más usados para EF de proteínas. Es un *soporte de tipo no restrictivo*, lo que significa que permite separar moléculas en función de su **carga** solamente. Se obtiene a partir de la modificación de la celulosa. La acetilación de los grupos –OH reduce la adsorción y el efecto electroendosmótico, obteniéndose mayor resolución que con el papel. Presenta baja tinción de fondo, por lo que es posible transparentarlo o disolverlo para detectar y recuperar, respectivamente, los componentes separados. Solo permite poner en evidencia proteínas cuya concentración es *mayor a 30 mg/dl*, lo que hace que la **sensibilidad** sea **menor** que en el caso de los geles.
- 3) **GEL**: permite separar moléculas en función del **tamaño**, la **forma** y **punto isoeléctrico**. Un gel es una malla o red tridimensional de fibras cruzadas, consiste en un polímero entrelazado que forma una matriz sólida pero porosa, habitualmente de agarosa o de poliacrilamida.
 - **GEL DE AGAROSA**: a mayor concentración, los poros serán más pequeños, por lo que la **resolución** será **mayor** y se podrán apreciar fragmentos más pequeños.
 - **GEL DE POLIACRILAMIDA**: la poliacrilamida, es una neurotoxina y debe ser manipulada con precaución. El gel está compuesto por diferentes concentraciones de acrilamida/bis-acrilamida para producir redes de diferentes tamaños. La porosidad es siempre menor que la de los geles de agarosa, por lo que **la resolución es aún mayor**. Es un *soporte de tipo restrictivo*, por lo que la separación además se realiza en función del **tamaño** de las partículas.
 - **SDS-PAGE** (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis = electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico): el SDS es un detergente que desnaturaliza proteínas y otorga una carga neta negativa, que les permite migrar en relación directa a su **masa**. La desnaturalización hace que se pierda la estructura terciaria y cuaternaria, de manera que la velocidad de migración es proporcional al **tamaño** y no a la estructura terciaria ni a su interacción con otras macromoléculas.

El **número de bandas o fracciones proteicas** que pueden apreciarse en el PTGR dependerá siempre del soporte que se utilice y las condiciones en que se realice la EF.

Cuando se utilizan *tiras de acetato de celulosa* normalmente se observan **cinco bandas** (si se manejan las condiciones pueden alcanzarse a ver **seis bandas**, que correspondería a beta 1-glob. y beta 2-glob.). Mientras que, cuando se utilizan *geles de alta resolución* (como poliacrilamida), pueden distinguirse otras bandas adicionales.

Etapas generales de la EF manual

Las **etapas generales** de la EF manual son:

1. **Separación** electroforética mediante aplicación de un campo eléctrico.
2. **Fijación** de las proteínas sobre el soporte.
3. **Revelado** de las proteínas para identificar su presencia y separación. Se realiza mediante colorantes ácidos (Negro Amido 10 B, rojo Ponceau) que se fijan sobre los grupos básicos de las proteínas. El exceso del colorante se elimina con mezclas, metanol-acético-agua destilada, sin que éste arrastre el colorante fijado a las proteínas.
4. **Cuantificación** de las fracciones electroforéticas, que puede realizarse a través de evaluación visual, elución o densitometría.

Para llevar a cabo la EF convencional se requiere de una cuba electroforética, una fuente de poder, sembradores, un soporte sólido, buffer, colorante y decolorante. Además del suero del paciente en estudio, se requiere de un suero control (paciente saludable).



Procedimiento de la EF manual

Soporte: acetato de celulosa (cellogel)

Los **reactivos** necesarios para la EF en acetato de celulosa son:

- Soporte: tiras de acetato de celulosa (cellogel):

Consideraciones para su conservación: el envase comercial es un sobre herméticamente cerrado, que contiene como solución conservante *metanol al 40 %*. Una vez abierto el sobre original, conservar las tiras en alcohol metílico al 40 %, en recipiente cerrado y refrigerado.

- Buffer a pH 8,6
- Colorante: Negro Amido 10 B
- Decolorante: metanol/ácido acético/agua (ver preparación en ANEXO).

A continuación se describen los **pasos a seguir** para el desarrollo de la misma:

1. Sacar las tiras de acetato de celulosa del alcohol metílico al 40 %. Secar (entre papeles de filtro) y sumergir en la solución buffer (pH: 8,6) a usar en la corrida, a temperatura de ambiente y durante 15 minutos como mínimo.

2. Al cumplir el tiempo del paso 1, sacar las tiras, secar (entre papeles de filtro), y realizar un corte indicativo que permita identificar a las distintas muestras. Colocar las tiras en el puente de la cuba, de manera que la parte opaca este ubicada hacia arriba, extendida perfectamente y que sus extremos se sumerjan en el buffer. Mantener la cuba tapada hasta el momento de la siembra.

3. Siembra: Destapar la cuba. Utilizando sembradores (dispositivos específicos, que poseen distintas medidas: micro, semi-micro y macro), depositar el suero control y el suero del paciente sobre la superficie opaca de la tira de cellogel y a 1 cm del borde. Tapar la cuba.

4. Electroforesis: Conectar la fuente, seleccionar un campo eléctrico de 200 voltios, durante aproximadamente 25 minutos. Observar el frente de corrida. Un detalle a tener presente para ver si circula la corriente es observar que la tapa de la cuba se vea empañada.

5. Coloración: Sacar las tiras de la cuba y colocarlas en la solución colorante de Negro de Amido 10B, por 5 minutos. Homogeneizar constantemente.

6. Decoloración: Colocar la tira en solución decolorante, con homogeneización constante. Realizar este procedimiento varias veces cambiando la solución decolorante hasta obtener una tira libre de colorante, de manera que únicamente queden las fracciones donde las proteínas estén coloreadas mediante el fenómeno de *fijación del colorante a las proteínas*.

Observación: cada solución decolorante deber ser reciclada y los frascos deben enumerarse del 1 al 4, de manera que la intensidad de la coloración disminuya en degradé (de fuerte a nula).

7. Cuantificación: según método:

7.1. Cuantificación visual: evaluación semicuantitativa, comparando con un patrón normal.

7.2. Cuantificación por elución: evaluación cuantitativa por espectrofotometría.

- a. Preparar la gradilla con seis tubos de ensayos cortos.
- b. Rotular en orden según fracciones (albumina, α 1, otras), y el sexto tubo como blanco.
- c. Cargar solución de ácido acético al 80 %, 2 ml al tubo de albumina y 1 ml a los restantes.
- d. Cortar las fracciones en los valles y colocar cada una en los respectivos tubos según corresponda. En el sexto tubo cortar una fracción de la tira de acetato de celulosa blanca de tamaño semejante a las fracciones α 1.
- e. Homogenizar correctamente, hasta disolución total.
- f. Leer en espectrofotómetro a λ : 540 nm, llevando a cero con el blanco (Tubo N°6)
- g. Anotar los valores de absorbancia según cada tubo.
- h. Multiplicar el tubo N°1 (albúmina) por dos (por tener doble cantidad de diluyente).
- i. Cálculo:

Valores relativos (%): realizar la sumatoria de todas las DO (dicho valor corresponde a 100%). Luego por regla de tres simple se calculan los porcentajes correspondientes a las distintas fracciones.

Valores Absolutos (g/dl): las concentraciones correspondientes a las distintas fracciones se calculan por regla de tres simple utilizando como referencia el valor de concentración de Proteínas totales (que corresponde al 100%).

7.3. Cuantificación por Densitometría: Se emplean fotómetros especiales que permiten cuantificar el colorante fijado a diferentes distancias del punto de aplicación de las proteínas. Primeramente se debe proceder a **transparentizar** el soporte. Para ello debe colocarse la tira de acetato de celulosa en metanol (2 min), luego en mezcla de metanol y ácido acético (1 min) (para su preparación ver ANEXO) y por último colocarla en un portaobjetos perfectamente limpio. Estirar bien y dejar en estufa a 37 °C hasta su transparentización propiamente dicha.

8. Informar según protocolo (Ver sección ETAPA POSTANALÍTICA - Modelo de protocolo de informe)

Gráfico N° 1: Diagrama general del procedimiento de EF convencional

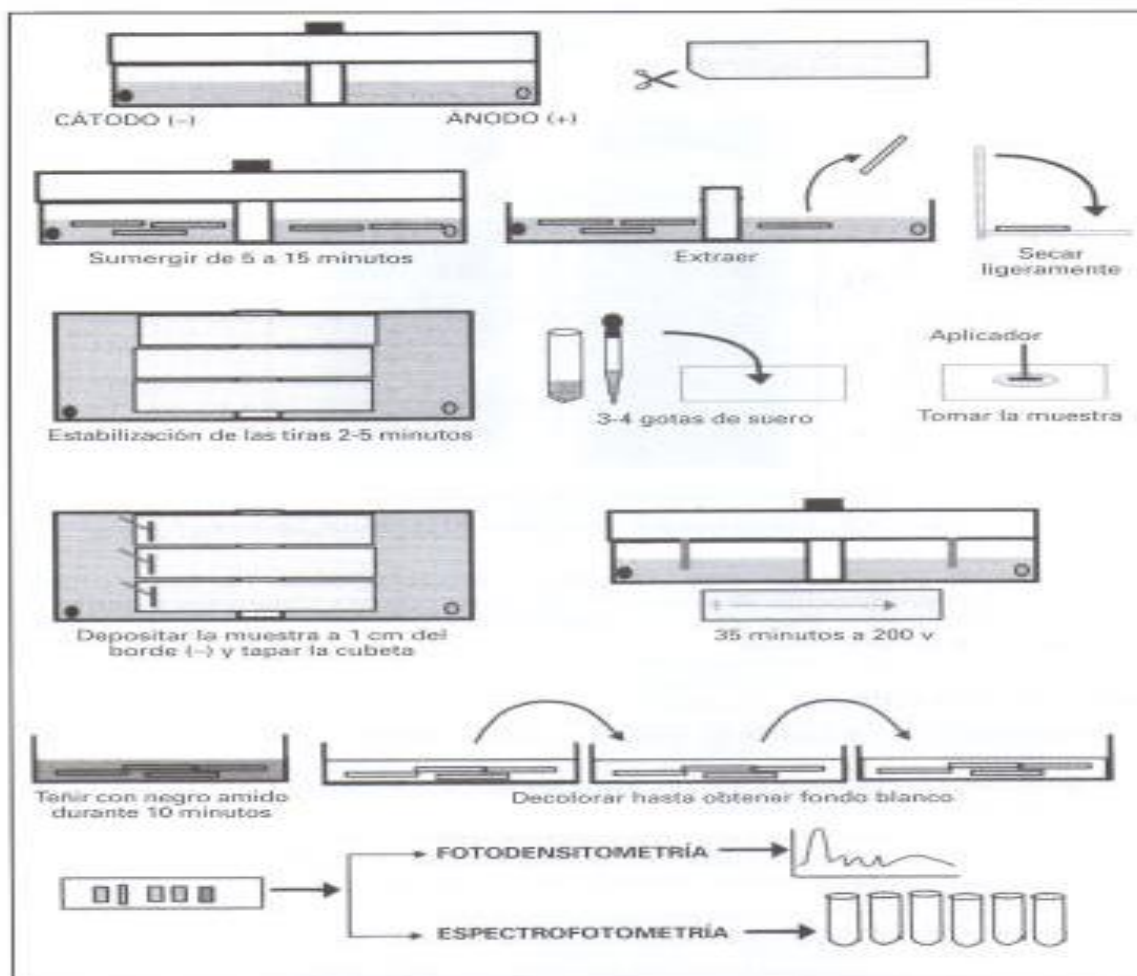


Gráfico Nº 2: Diagrama en soporte de tiras acetato de celulosa

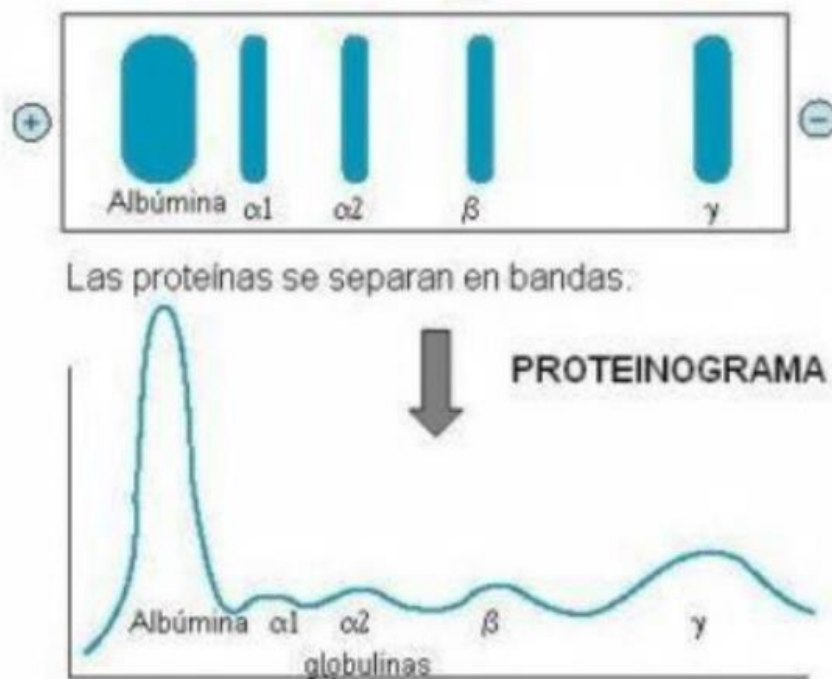
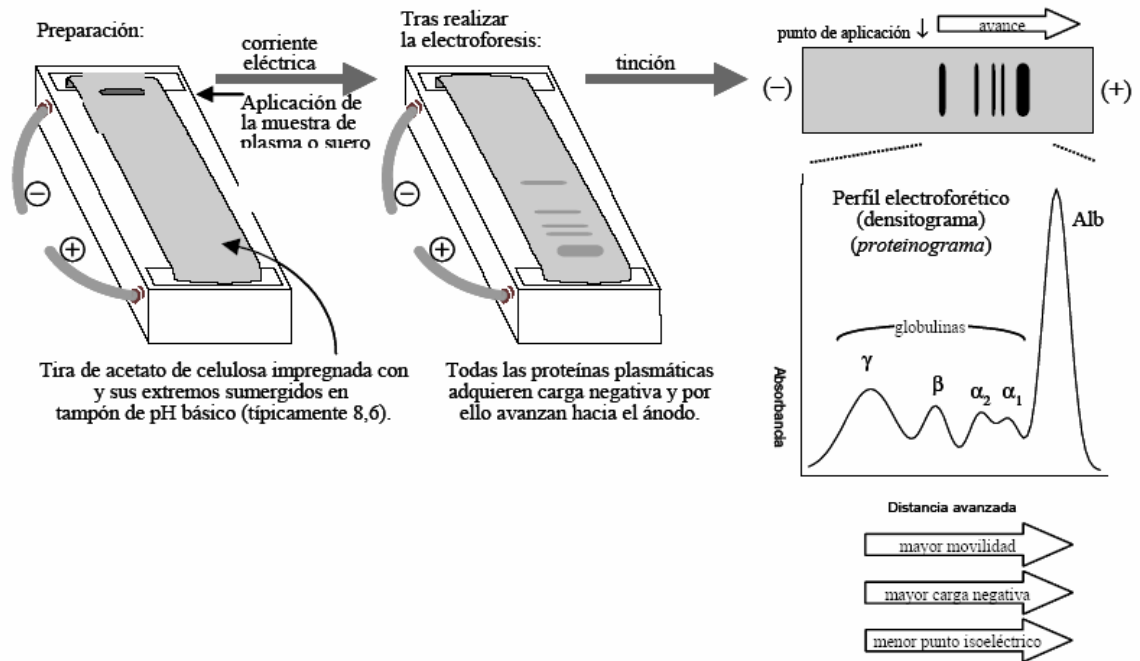


Gráfico N° 3: Diagrama de lectura de un densitómetro

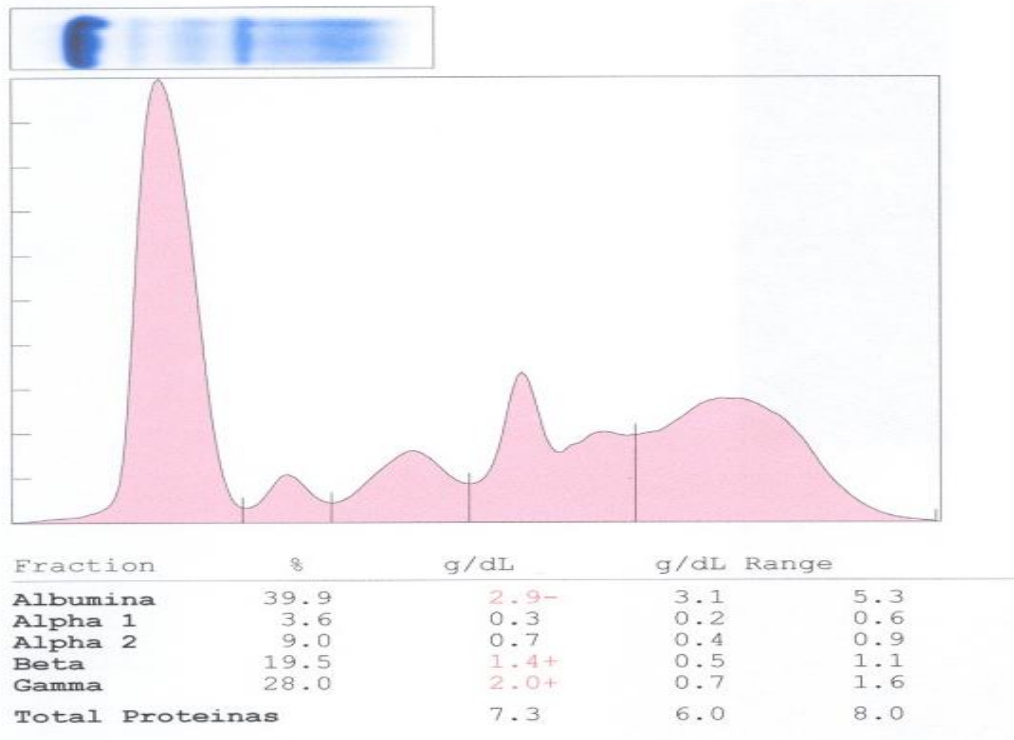
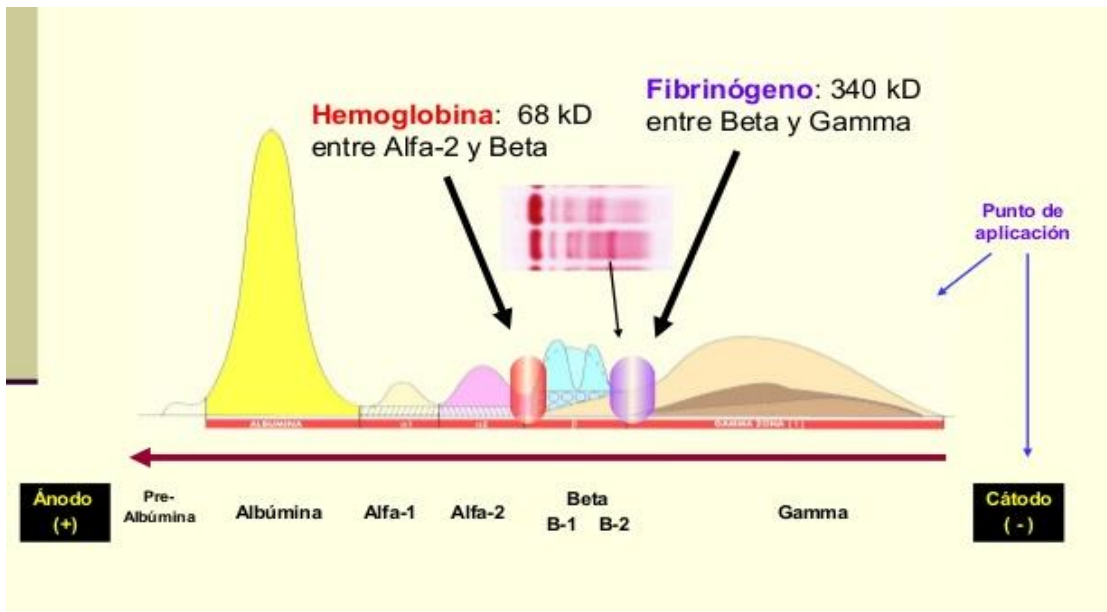


Gráfico N° 4: Hemoglobina y Fibrinógeno como interferencias en la EF

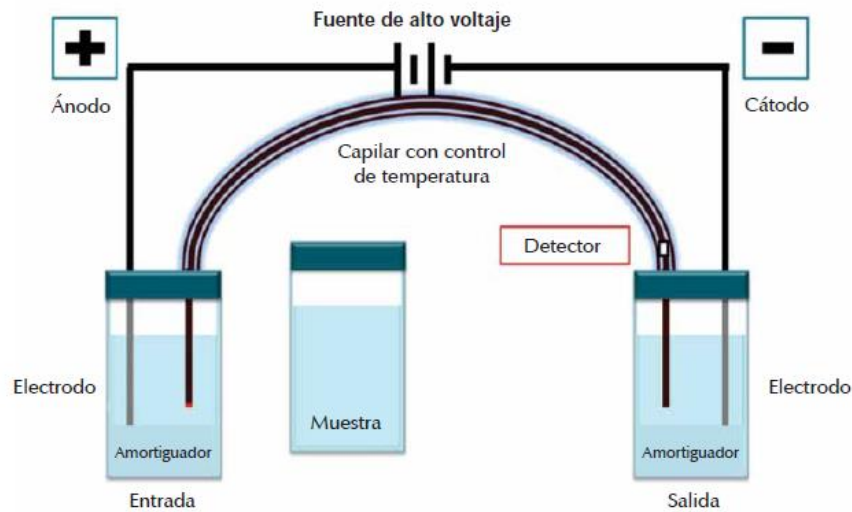


MÉTODO AUTOMATIZADO: ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar (EC) es una técnica que permite la separación y cuantificación de una amplia gama de analitos, entre ellos las proteínas.

Equipo: El sistema de electroforesis capilar cuenta con los siguientes elementos:

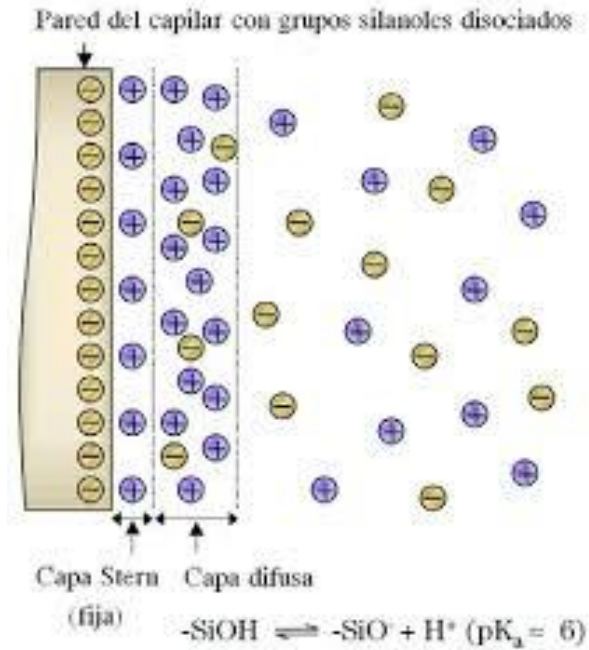
- * Fuente de alto voltaje (generadora del campo eléctrico)
- * Reservorios con solución buffer amortiguadora (donde se sumergen los electrodos y el capilar).
- * Electrodo (para generar el ánodo y el cátodo)
- * Capilar (compartimiento donde se realiza la separación)
- * Reservorios (donde se colocan las muestras)
- * Sistema de inyección de muestra (hidrodinámica y electrocinética)
- * Sistema de control de temperatura (por convección de aire o líquido).
- * Detector (conectado a un sistema de adquisición de datos)



Fundamento: La separación electroforética se efectúa en un capilar de sílice fundida de diámetro inferior a 100 μm . Estos capilares están recubiertos de un polímero (poliamida) que les confieren flexibilidad y disminuye su fragilidad, facilitando su manipulación. El proceso de separación electroforética consta de tres etapas principales:

1) *Acondicionamiento*: uno de los extremos del capilar es sumergido en una solución buffer. Debido a la naturaleza química de los grupos silanol (Si-OH) de la superficie interna del capilar, a $\text{pH} \geq 3$ son ionizados y la misma presentará carga negativa (Si-O⁻).

Por otra parte, como el buffer se compone de aniones y cationes, estos últimos forman una capa adyacente de contra-iones cargados positivamente (capa fija por adsorción o capa de Stern) a lo largo de toda la superficie interna y una segunda capa difusa y móvil, también positiva, hacia el centro del capilar (capa de Gouy – Chapman).

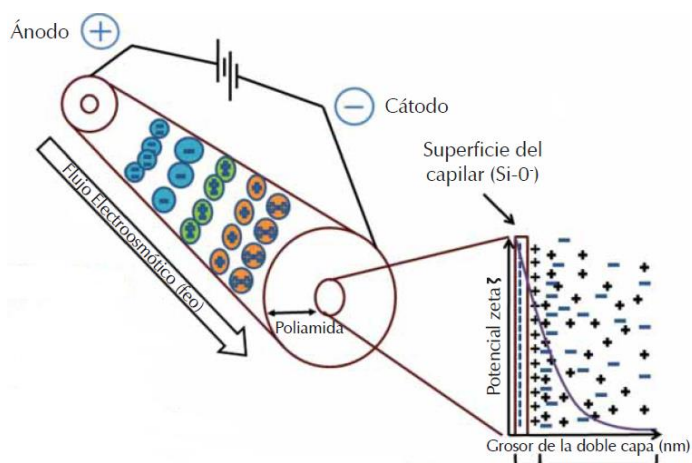
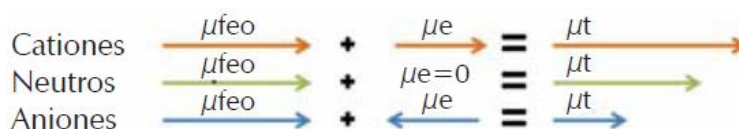


2) *Inyección de la muestra*: Cuando el capilar se encuentra lleno y acondicionado con la solución amortiguadora (fosfatos, boratos, citratos), en el mismo extremo se inyecta la muestra, de forma hidrodinámica (aplicando presión) o electrocinética (aplicando un campo eléctrico), de manera que un pequeño volumen de la misma ingresa al capilar.

3) *Separación electroforética*: los dos extremos del capilar son colocados en la solución buffer de separación. Dos electrodos también están presentes para aplicar un potencial eléctrico. En cuanto se aplica el potencial eléctrico, los iones de la capa difusa experimentan una fuerza paralela a la superficie y migran hacia el electrodo negativo (cátodo) del sistema, fenómeno conocido como **FLUJO ELECTROOSMÓTICO (EOF)**. El EOF se refiere a la migración de un líquido (buffer) respecto a una superficie cargada (pared del capilar) al aplicar un campo eléctrico. La movilidad del flujo electroosmótico (μ_{feo}) está en función de la viscosidad (η) de la

solución amortiguadora, la constante dieléctrica del medio (ϵ) y del potencial zeta (ξ) que se genera por la diferencia de cargas entre las capas.

La migración de los analitos dentro de un campo eléctrico (movilidad electroforética μ_e) está determinado por la fuerza del campo eléctrico y la carga del analito por lo tanto la movilidad total (μ_t) de los analitos dentro del capilar es la suma vectorial de μ_{feo} y μ_e , por lo que en la EC de zona, las moléculas de interés son separadas a lo largo de todo el capilar, en función a su **carga y masa**. Los cationes de la muestra adquieren mayor movilidad total seguidos por los analitos neutros, y los aniones serán los que presenten menor μ_t .

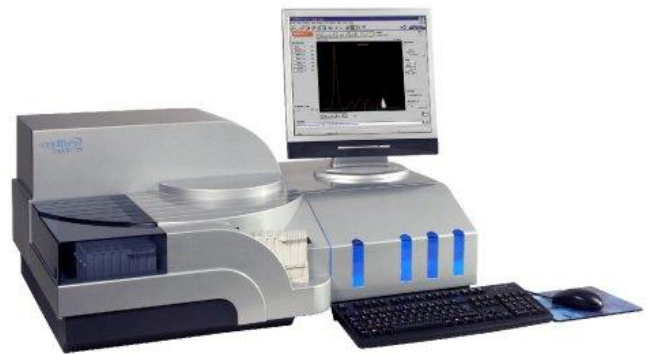


La detección se realiza directamente sobre el capilar, es decir que el mismo capilar actúa como celda de detección. El detector UV – visible es uno de los más empleados en la EC. La longitud de onda escogida es de 214 nm, o de 200 nm de acuerdo al equipo con el que se trabaja. El resultado final es un *electroferograma* con picos que representan las moléculas separadas dentro del capilar a un tiempo de migración particular para cada una en función de su movilidad electroforética.

Los equipos disponibles en el mercado y que utilizan el principio de EC en solución libre son: **Minicap Sebia Electrophoresis y Capillary Sebia Electrophoresis**, que se diferencian, entre otras cosas, en el número de determinaciones simultáneas que pueden realizarse y los tipos de muestras que pueden analizarse. El soporte es gel de agarosa.

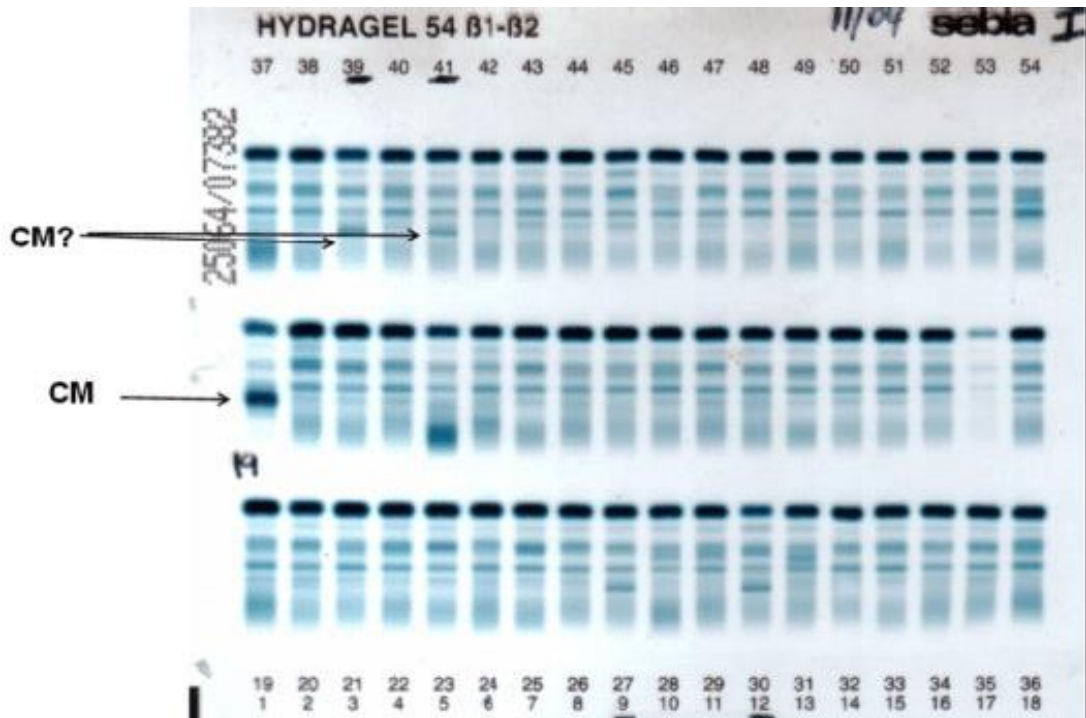


Minicap Sebia Electrophoresis



Capillarys II Sebia Electrophoresis.

DIAGRAMA DE UNA ELECTROFORESIS AUTOMATIZADA. EQUIPO SEBIA



Ventajas de la EC:

- Los capilares permiten la aplicación de altos campos eléctricos (100-500 V/cm) con una alta eficiencia para la disipación del calor, evitando los efectos adversos del calentamiento por efecto Joule.
- Los capilares son anticonvectivos en sí mismos, por lo tanto, no es necesaria la utilización de un gel soporte como medio.
- La detección es directa por lo que no existe el paso correspondiente a la coloración y decoloración de las corridas.
- Eficiencia alta: requiere pequeños volúmenes de muestras y la separación es muy rápida (menos de 5 minutos).
- Sensibilidad 10 veces mayor que la de la cromatografía líquida de alta performance.

Desventajas de la EC:

- Al introducir el electrolito en el capilar, pueden formarse burbujas de aire, que provocan fluctuaciones en la línea de base e interrumpen la corriente eléctrica.
- Opera a una única longitud de onda.

IV. IDENTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS

Los métodos disponibles para la identificación de Igs son: Inmunofijación (IF) e Inmunoelectroforesis (IEF). Ambas pueden identificar Igs específicas, pero los resultados de la IF son más fáciles de interpretar y por ello ha reemplazado a la IEF

INMUNOFIJACIÓN (IF)

La IF combina un fraccionamiento electroforético seguido de una reacción Ag-Ac in situ. Puede realizarse de forma manual o automatizada. El procedimiento del método manual es similar al descrito en la sección III donde se detallan las etapas del PTGR. En el caso de equipos automatizados como Sebia, existen los kits HYDRAGEL 6 IF Penta e HYDRAGEL 12 IF Penta, que están diseñados para la detección directa de la mayoría de proteínas monoclonales del suero humano mediante EF e IF en geles de agarosa alcalinos (pH 9.2)

Procedimiento de la IF por metodología manual:

1. Sacar las tiras de acetato de celulosa del alcohol metílico al 40 %. Secar (entre papeles de filtro) y sumergir en la solución buffer (pH: 8,6) a usar en la corrida, a temperatura de ambiente y durante 15 minutos.
2. Al cumplir el tiempo del paso 1, sacar las tiras, secar (entre papeles de filtro), y realizar un corte indicativo que permita identificar a las distintas muestras. Colocar las tiras en el puente de la cuba, de manera que la parte opaca este ubicada hacia arriba, extendida perfectamente y que sus extremos se sumerjan en el buffer. Mantener la cuba tapada hasta el momento de la siembra.
3. **Siembra:** Diluir el suero del paciente a una dilución tal que la concentración final del componente en estudio quede dentro de un rango 0.1 a 0.2 gr/dl. Destapar la cuba. Sembrar una vez el suero puro del paciente y cinco siembras del suero diluido del paciente. Tapar la cuba.

4. Electroforesis: Conectar la fuente, seleccionar un campo eléctrico de 200 V, durante aproximadamente 30 minutos. Una vez finalizada la corrida se corta la tira con la corrida del suero puro y se colorea con Negro Amido 10B por 5min, y luego se decolora.

La tira restante queda sobre el puente de la cuba y sobre cada calle de corrida se coloca un papel de filtro rectangular del tamaño del ancho de la siembra y el largo según posición del componente en estudio. Cada papel de filtro debe estar embebido con el **antisuero** correspondiente (el orden es anti- γ , anti- α , anti- μ , anti- κ y anti- λ).

Tapar la cuba e incubar en cámara húmeda durante 15 min., luego se retira los papeles de filtro y se la lava la tira de acetato con solución fisiológica durante un mínimo de 2 hs.

5. Coloración: Sacar las tiras de la cuba y colorearlas con Azul Brillante de Comassie durante 10 min.

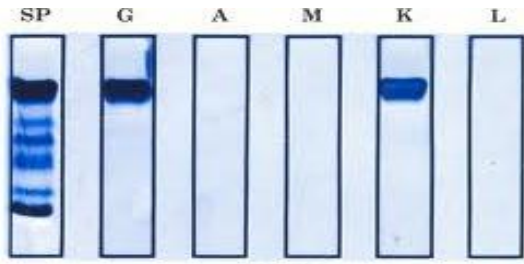
6. Decoloración: Colocar la tira en solución decolorante, con homogeneización constante. Realizar este procedimiento varias veces cambiando la solución decolorante hasta obtener una tira libre de colorante, de manera que únicamente queden las fracciones donde las proteínas estén coloreadas mediante el fenómeno de *fijación del colorante a las proteínas*.

7. Interpretación de los resultados e Informe.

Antisueros monoclonales específicos anti- γ , anti- α , anti- μ , anti- κ y anti- λ



ANTISUEROS



Luego de la incubación con los antisueros se puede observar que la banda monoclonal está conformada por cadenas pesadas gamma y livianas kappa. "Mieloma a IgG- κ"



IF: Se observa *respuesta policlonal* (suero diluido del paciente reacciona con todos los antisueros)
 SP: suero puro del paciente

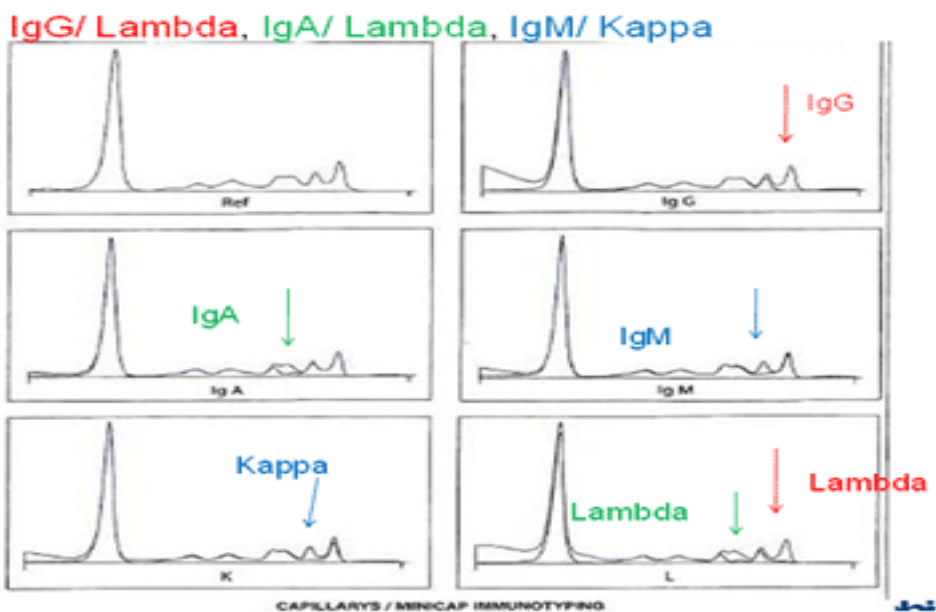
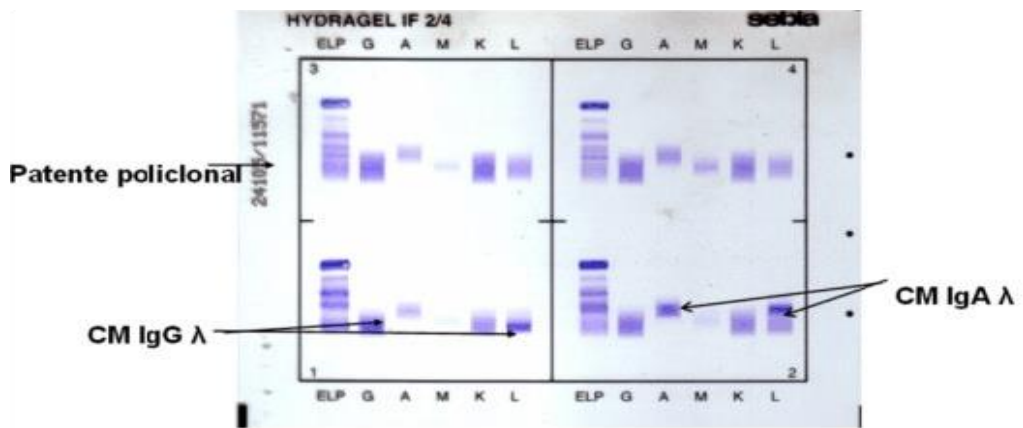
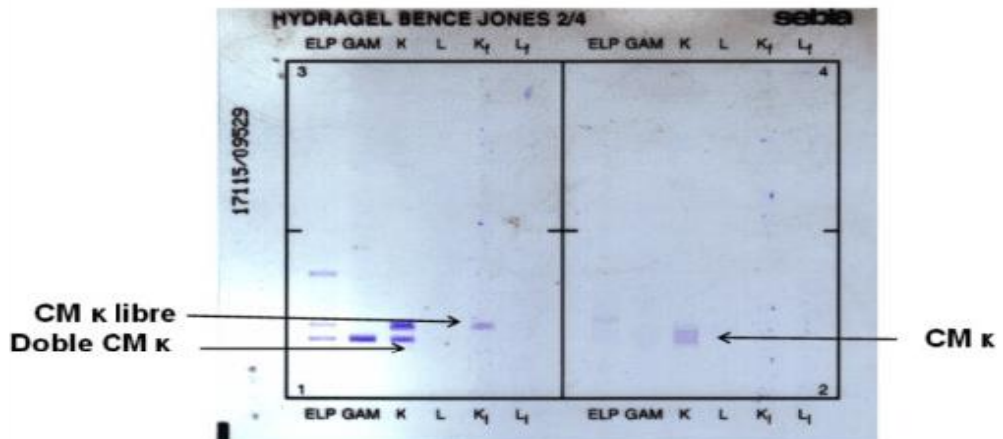
SP αγ αα αμ ακ αλ



IF: Se observa presencia de *componente monoclonal tipo IgG/λ* (suero diluido del paciente reacciona solamente con los antisueros anti-γ y anti-λ)
 SP: suero puro del paciente

SP αγ αα αμ ακ αλ

Inmunofijación - Método Automatizado Sebia.



INMUNOELECTROFORESIS (IEF)

La IEF es un procedimiento que combina dos métodos de separación de proteínas: la electroforesis y la inmunodifusión.

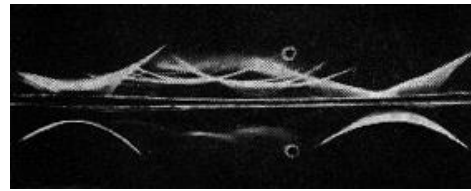
En un primer paso las proteínas se separan en un gel de agar de acuerdo a la densidad de cargas eléctricas por exposición a una diferencia de potencial.

Después de la separación electroforética, las proteínas reaccionan por doble difusión con un antisuero adecuado, colocado en una canaleta paralela a la dirección de migración electroforética y a una distancia conveniente.

Los anticuerpos se unen con sus correspondientes antígenos y dan en el gel bandas de precipitación específicas, generalmente en forma de arcos de precipitación



NORMAL



COMPONENTE MONOCLONAL

V. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Los métodos disponibles para medir proteínas son:

- a) Inmunodifusión radial (IDR)
- b) Turbidimetría
- c) Nefelometría
- d) Dosaje de Cadenas Ligeras Libres (Freelite - Inmunodiagnóstico)

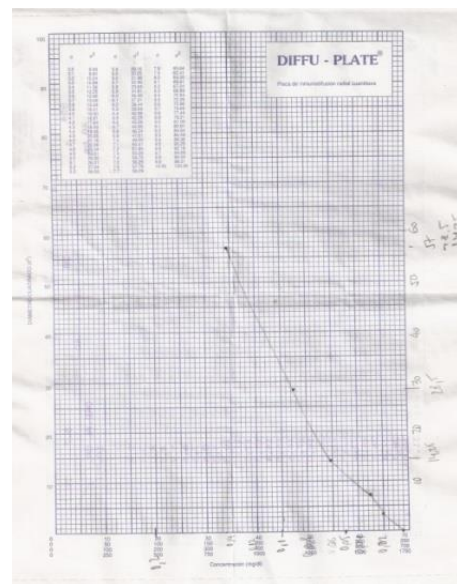
INMUNODIFUSIÓN RADIAL (IDR)

Fundamento: Se incorpora la solución de Ac al agar fundido y se deposita sobre placas de Petri o sobre portaobjetos de vidrio. Una vez solidificado se realizan pequeños pocillos en los que se introduce la solución de Ag a investigar (muestra: suero). Las moléculas del Ag difunden desde el pocillo en todas direcciones rápidamente a través del agar. Tras un período de incubación definido, se observará un círculo de precipitación alrededor del pocillo donde se realizó la siembra. Esta técnica se utiliza habitualmente para dosar Igs (IgG, IgM o IgA) o la fracción C3 del complemento en el suero del paciente.

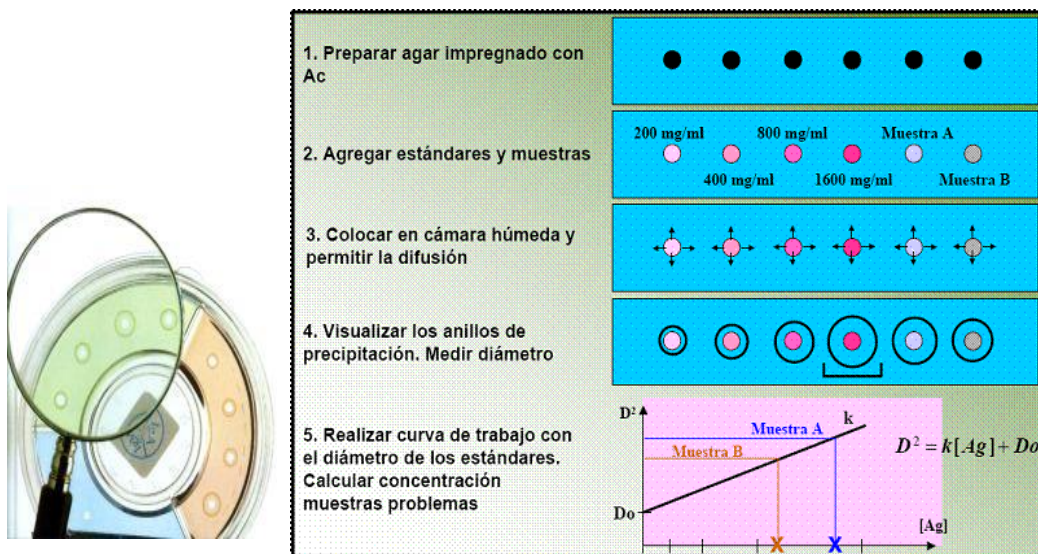
Lectura: El diámetro del círculo de precipitación es proporcional a la cantidad de Ag presente en la muestra. De esta forma, comparando el diámetro obtenido, con los de concentraciones conocidas del Ag, puede obtenerse una estimación cuantitativa del Ag.



Placa comercial de IDR



Procedimiento y cálculo de la concentración proteica



1. Preparar agar impregnado con Ac

2. Agregar estándares y muestras

3. Colocar en cámara húmeda y permitir la difusión

4. Visualizar los anillos de precipitación. Medir diámetro

5. Realizar curva de trabajo con el diámetro de los estándares. Calcular concentración muestras problemas

200 mg/ml 400 mg/ml 800 mg/ml 1600 mg/ml Muestra A Muestra B

$$D^2 = k[Ag] + D_0^2$$

TURBIDIMETRÍA/NEFELOMETRÍA

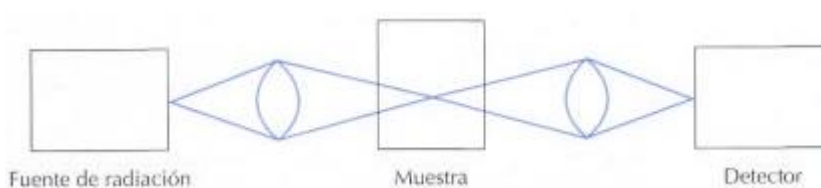
En la actualidad, la Turbidimetría y la Nefelometría han reemplazado a la IDR.

Cuando un haz de luz choca con una partícula en suspensión parte de la luz se dispersa, parte de la luz se refleja y parte de la luz se absorbe. La dispersión de la luz depende de: la longitud de onda de la luz, del tamaño de la partícula y del índice de refracción de la partícula en relación con el medio que la rodea.

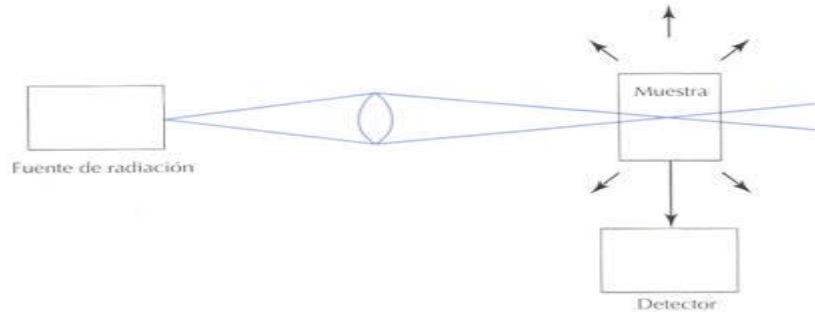
La dispersión de la luz se puede medir por **TURBIDIMETRÍA** o por **NEFELOMETRÍA**.

En ambas técnicas, para dar como resultado una concentración de proteína concreta, se compara la cantidad de luz dispersada o la tasa de aumento de dispersión con los valores de dichos parámetros en estándares proteicos conocidos.

La *Turbidimetría* mide la disminución de la luz transmitida a través de una suspensión de partículas utilizando para ello un espectrofotómetro (detector en la misma dirección del haz de luz, se mide A o T). Se suele utilizar para soluciones concentradas (para que haya una buena disminución de la luz transmitida) ej. Determinación de PT en suero, LCR u orina (haciendo que las proteínas precipiten con TCA o ácido sulfosalicílico).



La *Nefelometría* mide la luz dispersada en dirección distinta a la luz emitida (generalmente con ángulos que oscilan entre 15 y 90°). Utiliza como instrumento el nefelómetro (en el que el detector se ubica con un ángulo que oscila entre 15 y 90° ej. a 90°). Se suele utilizar para concentraciones más diluidas.



Aspectos Prácticos a tener en cuenta:

Tanto en los reactivos como en el suero pueden existir partículas que produzcan una dispersión de luz no deseada ej. Lipoproteínas, quilomicrones.

La intensidad de la luz dispersada aumenta al disminuir la λ . Las proteínas suelen tener un pico de absorción en el ultravioleta ($\lambda < 300\text{nm}$) y los cromógenos del suero entre 400-425nm; por todo ello se suele trabajar a longitud de onda que oscilen entre 320-380nm y 500-600nm.

Para cuantificar proteínas concretas en una muestra, se utilizan anticuerpos que reaccionan con las mismas, en este caso se habla de inmunoturbidimetría e inmunonefelometría.

Cuando se ponen en contacto un Ag y un Ac específico contra ese antígeno, ambos reaccionan y forman un complejo Ag-Ac. Inicialmente los complejos se forman rápidamente, pero, existe una segunda fase de crecimiento de complejos más lenta y, es precisamente en esta fase en la que aparece la dispersión de la luz. Así, en la inmunoturbidimetría e inmunonefelometría se mide la dispersión de la luz provocada por los complejos Ag-Ac. En ocasiones los Ac se unen a esferas de látex para aumentar el tamaño de los complejos (inmunoanálisis potenciados).

DOSAJE DE CADENAS LIGERAS LIBRES (FREELITE - INMUNODIAGNÓSTICO)

Las cadenas ligeras libres (CLL) son cadenas livianas de Igs que no se han unido a las cadenas pesadas y que circulan libremente por la sangre. Esta prueba mide la cantidad de CLL de tipo kappa y lambda en sangre, y permite establecer un cociente (ratio) kappa/lambda que proporciona información complementaria en el diagnóstico y seguimiento de las discrasias de células plasmáticas, entre las que se incluyen el mieloma múltiple (MM) y la amiloidosis primaria.

En el MM el nivel de producción de CLL está relacionado con la actividad del crecimiento de las células del mieloma. También se emplea para monitorizar la eficacia del tratamiento, de manera que una disminución de su concentración y la normalización progresiva del cociente kappa/lambda indican respuesta al tratamiento.

Normalmente, se produce un exceso de cadenas ligeras libres, por lo que éstas pueden ser detectadas en personas sanas donde el cociente kappa/lambda está comprendido entre 0.26 y 1.65. También, en enfermedades renales no asociadas a discrasias de células plasmáticas pueden observarse aumentos de la concentración de las cadenas ligeras libres, a pesar de que el cociente kappa/lambda sea normal. Contrariamente, en trastornos que afectan a la médula ósea inhibiéndola, se pueden observar disminuciones de la concentración de cadenas ligeras libres con un cociente kappa/lambda normal

Fundamento: Freelite es un marcador específico y sensible de CLL κ (kappa) y λ (lambda). Los anticuerpos policlonales purificados por afinidad, reaccionan específicamente con formas libres de la cadena ligera κ y λ , y están recubiertos con partículas de látex. La medición se realiza por nefelometría y Turbidimetría. Tradicionalmente los pacientes con MM han sido diagnosticados y seguidos mediante uroproteinograma. Sin embargo, recientemente se observó que Freelite presenta mayor sensibilidad que el uroproteinograma, por lo que se pretende que las guías internacionales de MM sean modificadas e incluyan Freelite en lugar de la recolección de orina de 24 hs y la EF correspondiente. Además evita la obtención de falsos negativos en pacientes con alteraciones de la función renal.

ETAPA POST ANALITICA

Esta etapa del estudio de PP, incluye la interpretación de los resultados obtenidos en la etapa analítica y el informe de los mismos.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

INTERPRETACIÓN DE PROTEINEMIA

Valores de referencia para Proteinemia

EDAD	VALORES	UNIDADES
Adultos	6 – 8	g/dl
Recién nacidos	5,2 – 9,1	g/dl

En base a los valores de referencia de PT, podemos realizar las siguientes *interpretaciones bioquímicas-clínicas*:

- **NORMOPROTEINEMIA:** concentración de PT dentro de los valores de referencia.
- **HIPERPROTEINEMIA:** aumento de la concentración de PT por encima del límite superior del valor de referencia. Mecanismos generales: aumento de la síntesis de proteínas específicas (siempre globulinas) o deshidratación.
- **HIPOPROTEINEMIA:** disminución de la concentración de PT por debajo del límite inferior del valor de referencia. Mecanismos posibles: defectos en la síntesis proteica, grandes pérdidas o catabolismo proteico excesivo. Debe tenerse en cuenta que todas las hipoproteinemias, lo son por hipoalbuminemia.

INTERPRETACIÓN DE ALBUMINEMIA

Valores de referencia de Albuminemia

PARAMETRO	VALORES	UNIDADES
Albuminemia	3,5 a 5,5	g/dl
Relación A/G	1,2 a 2,2	

En base a los valores de referencia, frente a un resultado de *Albuminemia*, podemos interpretar como:

- **NORMOALBUMINEMIA:** concentración de Albúmina dentro de los valores de referencia
- **HIPOALBUMINEMIA:** valores de albuminemia por debajo del límite inferior del valor de referencia. Puede deberse a:
 - aumento en la excreción urinaria o fecal (síndrome nefrótico, gastroenteropatías),
 - infecciones prolongadas,
 - aumento del catabolismo
 - disminución de la síntesis (enfermedad hepática, alcoholismo),
 - desnutrición, malabsorción
 - quemaduras severas
- **HIPERALBUMINEMIA:** NO existen aumentos absolutos de albuminemia, pero Sí *aumento relativo* en caso de reducción del contenido de agua plasmática (Ej. Deshidratación, vómitos, otros)

INTERPRETACIÓN DEL PROTEINOGRAMA: PATRONES ELECTROFORÉTICOS

Valores de referencia para las distintas fracciones proteicas

	RN	NIÑOS	ADULTOS	
	g/dl	g/dl	g/dl	%
Proteínas totales	4,6 - 7,4	6,4 - 8,1	6 - 8	
Albúmina	2,5 - 3,4	3,9 - 5,0	3,2 - 5,2	52 - 65
A1-globulina	0,1 - 0,3	0,2 - 0,3	0,1 - 0,3	2 - 5
A2- globulina	0,3 - 0,5	0,4 - 1,0	0,4 - 1,0	7 - 13
Beta-globulina	0,2 - 0,6	0,5 - 1,1	0,5 - 1,1	8 - 14
Gamma-globulinas (IgG, IgA e IgM)	0,2 - 1,0	0,7 - 1,2	0,8 - 1,8	12 - 23

Cada **fracción de las globulinas** está formada por un grupo de proteínas con una movilidad electroforética semejante, aunque muy distintas en cuanto a su estructura y función, por ello, aunque el resultado de la fracción sea normal, puede existir variación porcentual en sus componentes. Esto no ocurre con la fracción albúmina, porque es una única proteína.

PROTEINEMIA	VARIACIÓN DE LAS FRACCIONES		COMPATIBLES CON LOS PROCESOS
Hiperproteinemia	Albúmina baja y gran aumento de globulinas (G).	Aumento de β G:	Plasmocitoma y Macroglobulinemia.
		Aumento de γ G:	Plasmocitoma, Macroglobulinemia, Kala-Azar, Linfogranuloma, Cirrosis Esplenomegálicas y Endocarditis Lenta Abacteriana.
Variación ligera o nula de la Proteinemia	Albúmina baja y aumento de la α G y discreto de γ G		Inflamaciones, infecciones agudas y subagudas. Neoplasias.
	Albúmina baja, aumento dominante de γ G y a veces ligero de β G		Hepatitis, cirrosis hepática e infecciones crónicas.
	Albúmina baja y aumento discreto de α G, β G y γ G		Neoplasias.
Hipoproteinemia	Albúmina muy baja aumento de α 2G y β G y G normal o disminuida.		Nefrosis.
	Albúmina muy baja y aumentos nulos o discretos de α G, β G y γ G		Neoplasias digestivas, esteatorreas, enfermedades consuntivas y carenciales
	Albúmina muy baja y aumento de γ G		Cirrosis hepáticas de larga evolución, infecciones crónicas consuntivas.

Es importante tener presente los mecanismos responsables de dichas variaciones, tales como: *disminución de la síntesis (ej: hepatopatías, desnutrición); pérdida de proteínas por riñón (ej: nefropatía, fallo renal); aumento de síntesis (infecciones crónicas, gamapatía monoclonal); entre otras.* De esta manera el PTGR puede ayudar al diagnóstico de diversas entidades.

Los patrones electroforéticos más frecuentes en la práctica clínica son:

1. *Modelo de malnutrición. Ej: desnutrición, malabsorción*
2. *Perdida de proteínas (tipo NO selectivo). Ej: enteropatía con pérdida de proteínas, quemaduras, hemorragias*
3. *Modelo nefrótico (pérdida de proteínas selectiva)*
4. *Enfermedad hepatodegenerativa*
5. *Modelo de cirrosis*
6. *Inflamación aguda*
7. *Inflamación crónica*
8. *Gammapatía policlonal*
9. *Hipogamaglobulinemia*
10. *Gammapatía monoclonal*

1. Modelo de malnutrición

Hipoproteinemia debida a una reducción de la síntesis. Se observan disminuciones en todas las fracciones, pero la reducción más acentuada se ve a menudo en la albúmina.

La inanición severa, malabsorción o la inanición asociada con enfermedad crónica severa, presentan una reducción marcada de albumina a niveles inferiores a 2 g/dl. Ante la inanición severa el sistema inmune se afecta enormemente, con síntesis disminuida que origina una hipogammaglobulinemia

2. Enteropatía con pérdida de proteínas

Hipoproteinemia en la cual la mayoría de las fracciones disminuyen, debido a la combinación de una síntesis disminuida y una pérdida incrementada, aunque la fracción α_2 puede ser relativamente superior debido a la coexistencia de una respuesta de fase aguda (haptoglobina) o a una retención selectiva de moléculas grandes (α_2 -macroglobulina)

3. Modelo nefrótico

Hay pérdida selectiva de proteínas a nivel glomerular, en base a su peso molecular. En la proteinuria glomerular, se pierden las proteínas de bajo peso molecular (Alb, Tf, α_1 AT, gammaglobulinas IgG e IgA), mientras que las de alto peso molecular (α_2 -macroglobulina, β -

lipoproteína e IgM) quedan retenidas en el suero. El uroproteinograma mostrará preponderancia de proteínas de bajo peso molecular.

En algunas instancias el modelo nefrótico es acompañado por la condición inflamatoria aguda o crónica, observándose un aumento de la fracción α 1 globulinas debido al aumento de reactantes de fase aguda.

En la proteinuria tubular, hay deterioro de la reabsorción tubular de pequeñas proteínas, observándose en el uroproteinograma fracciones α , β y γ -globulinas, y sólo una pérdida mínima de albumina.

En el caso particular de la nefrosis lúpica, también se verá una reducción de C3, debido a su incorporación dentro de los complejos inmunológicos encontrados en las regiones subepiteliales y subendoteliales del glomérulo.

4. Enfermedad hepatodegenerativa

Hipoproteinemia donde la Albumina y la haptoglobina parecen ser las primeras proteínas reconocibles que disminuyen a medida que el daño hepatocelular avanza. Se observa aumento de β -lipoproteína y de la fracción gammaglobulina. Cada una de estas bandas variará dependiendo de la dimensión del daño hepatocelular, ya que se puede considerar que el hígado es la fuente de mayor producción proteica, salvo las inmunoglobulinas.

En la hepatitis estará presente un modelo típico de inflamación aguda o crónica.

En el caso de los pacientes con hepatitis lúpica, se mostrará aumento de gamaglobulina, sobre todo IgG, y una fracción beta disminuida o ausente por consumo de complemento.

En la enfermedad hepática obstructiva se observa un modelo inflamatorio crónico con lipoproteína beta aumentada

5. Modelo de cirrosis hepática

El daño hepatocelular de la cirrosis origina, por un lado, disminución de la capacidad de síntesis de Albúmina y por otro lado, el desequilibrio de presiones hemodinámicas que conduce a la formación de líquido ascítico (el cual contiene casi exclusivamente albúmina). La pérdida de Albumina está equilibrada hasta cierto punto por un marcado aumento policlonal de inmunoglobulinas, con una fracción γ que puede contribuir significativamente a la presión oncótica.

De esta manera, se produce una amplia fracción de gamaglobulina que parece originarse en la fracción β y constituye un fenómeno característico llamado “puente β/γ ”; se produce a expensas del aumento de IgA sobretodo, pero también de IgG. Dependiendo de la severidad de la cirrosis existe con frecuencia una disminución de globulinas $\alpha 1$ $\alpha 2$, sobretodo Haptoglobina y Transferrina.

En el caso de aumento de la fracción $\alpha 1$ y Haptoglobina puede indicar una inflamación implícita o enfermedad neoplásica asociada a la cirrosis.

Un puente β/γ falsa puede aparecer en el caso de enfermedades malignas e inflamatorias. En los puentes β/γ real se observan aumentos de IgA y en menor medida de IgG e IgM y disminución de Tf.

6. Modelo inflamatorio agudo

Este modelo se caracteriza por aumentos de globulinas $\alpha 1$ y $\alpha 2$. En general el mayor impacto se observa en la Haptoglobina, mientras que otras proteínas, como α -1AT pueden contribuir a esta respuesta. Albumina y Transferrina, son proteínas de fase aguda negativas, por lo tanto, disminuyen.

Generalmente componentes menores, como la Proteína C Reactiva, no contribuyen significativamente a este patrón (por sensibilidad metodológica), aunque su medición inmunológica puede estar aumentada hasta 1000 veces.

En caso de un proceso hemolítico activo, la Haptoglobina puede estar normal o disminuida, y puede haber una banda independiente de hemoglobina que migra en la región beta.

En caso de hemólisis in vitro puede verse una banda del complejo Hb-Hp que migra en $\alpha 2$ de manera diferente a la hemoglobina

7. Modelo inflamatorio crónico o de respuesta tardía

Es una prolongación de la respuesta de fase aguda, con Haptoglobina elevada, mayor reducción de albúmina y un incremento policlonal de inmunoglobulinas que ensanchan la región γ .

Este modelo puede corresponderse a diversas situaciones clínicas: infecciones crónicas, enfermedad hepática, trastornos del tejido conectivo, alergias y enfermedades malignas. En caso de aumento marcado de Haptoglobina, puede sospecharse de un trastorno neoplásico.

8. Gamapatía policlonal

Este patrón electroforético se debe al aumento heterogéneo de inmunoglobulinas.

Son muchas las condiciones que pueden dar lugar al aumento de la producción de anticuerpos y en general suele haber una respuesta inflamatoria superpuesta.

Ejemplos frecuentes de estas situaciones son la enfermedad hepática y las enfermedades del tejido conectivo.

Se puede establecer la naturaleza policlonal del modelo mediante la medición de proteínas específicas IgG, IgA e IgM. Siempre debe tenerse en cuenta que los niveles de Igs varían con la edad.

9. Hipogamaglobulinemia

Este modelo se manifiesta con una casi o completa ausencia de fracción gamma.

Ocurre normalmente en recién nacido antes de la maduración de su sistema inmune. También ocurre en algunos estados de inmunodeficiencia congénita. En adultos más comúnmente se observa con alteraciones linforreticulares, donde las células plasmáticas fueron desplazadas por proliferaciones de linfocitos y también tras quimioterapia para la erradicación de tumores. Todos los adultos donde se encuentre una hipogammaglobulinemia deben ser examinados por posible enfermedad de cadenas livianas. Estos pacientes producen cadenas livianas monoclonales excesivas cuyo peso molecular les permite pasar por la membrana glomerular y ser excretadas en la orina

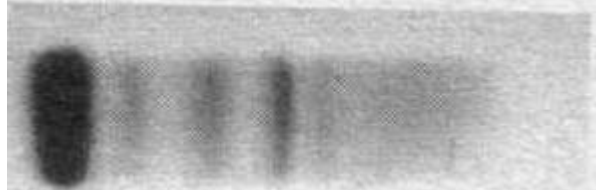
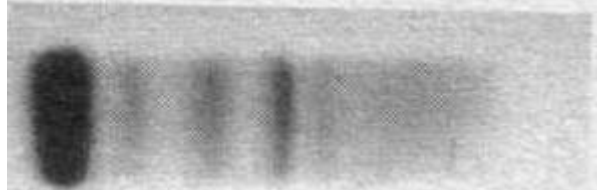
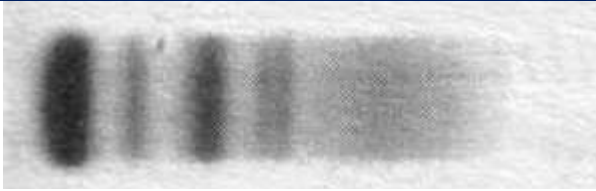
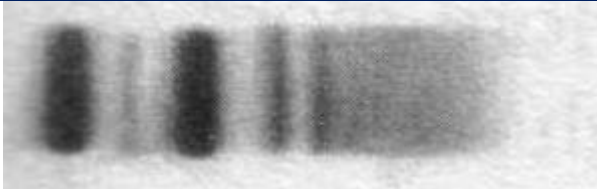
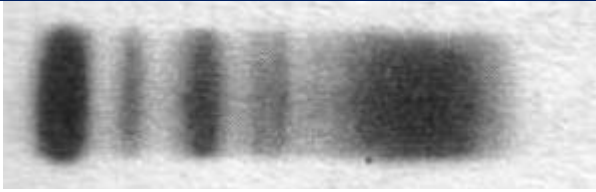
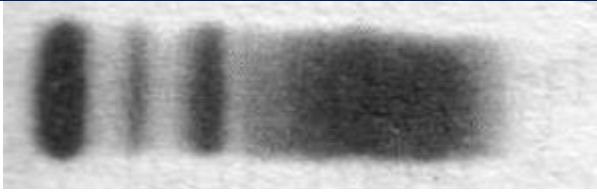
10. Gamapatía monoclonal


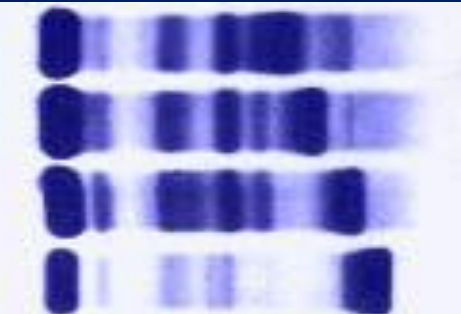
Modelo caracterizado por una banda homogénea (componente M) de movilidad restringida observada en la región de γ -globulinas, e incluso migrar desde la región α_2 hasta el punto de siembra del PTGR.

Se corresponde con una Ig. secretada como consecuencia de una proliferación monoclonal de células plasmáticas. Frente a este patrón electroforético se debe:

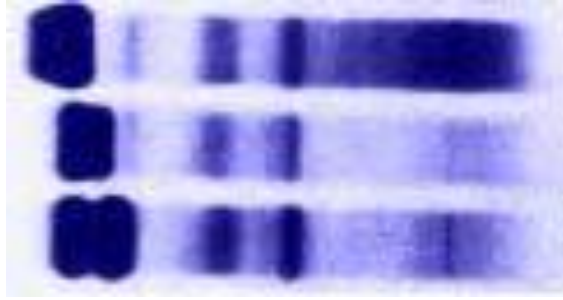
- *Identificar el componente M en suero y orina.* Es decir, se realiza IF o IEF a la muestra de suero del paciente y además un Uroproteinograma con una muestra de orina de 24 hs por la posible presencia de cadenas livianas eliminadas vía renal.
- *Cuantificar el componente M:* Se realiza a partir del PTGR

- *Cuantificar Igs policlonales:* se realiza por turbidimetría o IDR. Por lo general la fracción gamma policlonal normal está disminuida, debido a que las células plasmáticas normales son reemplazadas por un clon maligno.

PATRONES ELECTROFORETICOS	
Normal	Normal
	
Reacción inflamatoria (fase aguda)	Síndrome Nefrótico
	
Reacción inflamatoria (crónica)	Cirrosis Hepática
	

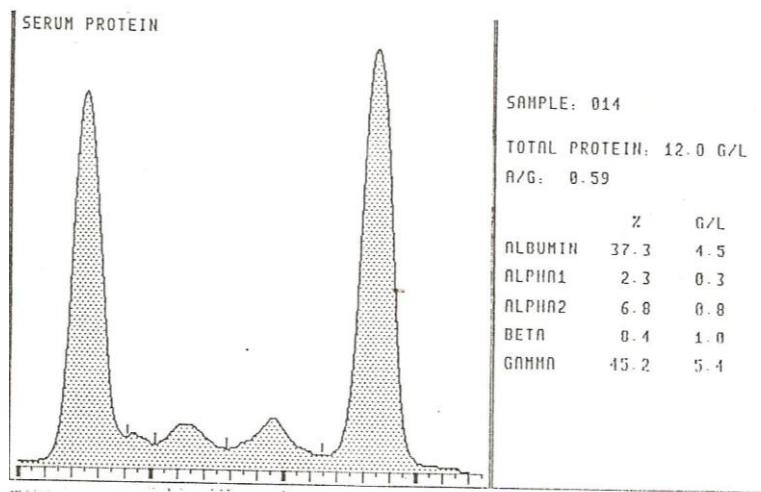
Alteraciones de la fracción de γ globulinas	Principales alteraciones del Proteinograma: (Componentes M) En orden IgA, IgG, IgG e IgM
	

Principales alteraciones del proteinograma:



Bisalbuminemia

DIAGRAMA DE UN DENSITOMETRO, Muestra con COMPONENTE M



MODELO DE PROTOCOLO DE INFORME

LABORATORIO

NOMBRE:

ORDEN N°:

DNI:

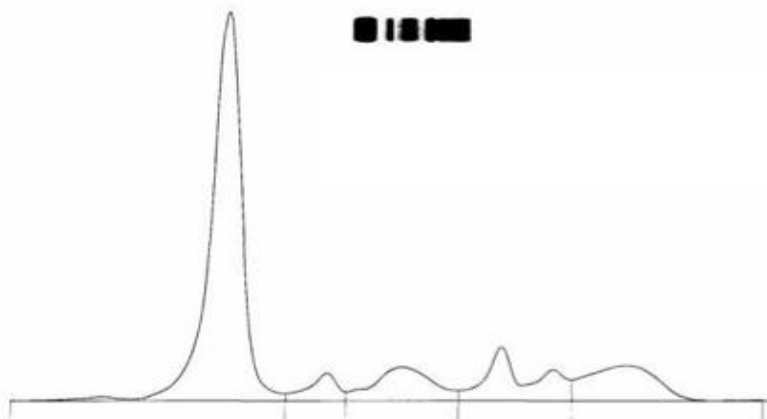
FECHA DE NACIMIENTO:

MEDICO SOLICITANTE:

MUESTRA BIOLÓGICA:

PARAMETROS	Resultado	Valores de referencia
	g/dl	g/dl
PROTEINAS TOTALES		
Método:		
ALBUMINA		
Método:		

PROTEINOGRAMA ELECTROFORÉTICO



FRACCION	Resultado %	Valores de referencia %	Resultado g/dl	Valores de referencia g/dl
Albúmina		52 - 65		3,2 – 5,2
A1-globulina		2 - 5		0,1 - 0,3
A2- globulina		7 – 13		0,4 – 1,0
Beta-globulina		8 - 14		0,5 – 1,1
Gamma-globulina		12 - 23		0,8 – 1,8
Relación A/G:				

Observaciones:

Firma y sello

Matricula del Profesional Bioquímico

ANEXO

Preparación de reactivos para Electroforesis Convencional - Proteinograma

Buffer: hay muchas fórmulas, uno es el veronal sódico al 0.04M,

- Veronal sódico 8.24gr
Agua desestilada 1000 ml de solución
Conviene preparar menos, el buffer se puede usar muchas veces, una vez hecha la corrida se guarda en un frasco bien tapado para utilizar una próxima vez. El mayor inconveniente es la contaminación por hongos.
- Borato pH=8.6 con indicador de frente de corrida

Líquido colorante: Esta solución también puede usarse muchas veces, una vez coloreada la corrida se guarda en un frasco bien tapado

- Negro Amido 10B 0.5 gr
- Metanol 45 ml
- Ac Acético 10 ml
- Agua 45 ml

Líquido decolorante:

- Metanol 47.5 ml
- Ac Acético 5 ml
- Agua 47.5 ml

Solución transparentizadora:

- Metanol 85 ml
- Ac. Acético 14 ml
- Glicerina 1 ml

Solución de Elución

- Ác. Acético al 80%

BIBLIOGRAFIA

- J. GRAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS 4ta Ed. JMS. Barcelona 1983. Capítulo 6
- Tood-Sanford&Davidsohn; Henry, El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico. 20ma Ed. MARBÁN LIBROS, S. L. 2005. Tomo 1.
- Inserto Wiener lab. Proti2 (dosaje de proteínas totales y albúmina)
- Adolfo Kalinov. Variables Bioquímicas para el diagnóstico médico. Editorial Janssen Cilag. Año 1995. Capítulo 4
- Raquel Osatinsky. Las proteínas séricas. 1° edición. Ciudad autónoma de Bs As 2012.

II

LABORATORIO DEL METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

CUERPO DOCENTE

JTP Malvasi, Graciela Noemi

JTP Dusse Graciela Viviana

Auxiliar 1ra Formichela María Mercedes

Auxiliar Egresada Ad-Honorem Medina Magali Ivana

Auxiliar Alumna Ad-Honorem Servian Araceli

Prof. Adj. Malarczuc Elba Cristina

Prof. Adj. Galeano Zulema

INTRODUCCIÓN

En el estudio de los Hidratos de Carbono se destacan diferentes Análisis de Laboratorio que aportan información importante para las decisiones a tomar en la práctica clínica; tales como, diagnosticar los diferentes **Estados Hiperglucémicos (EH)** entre ellos Diabetes Mellitus (DM), participar en el control del tratamiento del paciente con DM, y definir el diagnóstico y seguimiento de las complicaciones crónicas y agudas de pacientes que padecen DM; y cada una de ellas con ventajas, desventajas y costos diferentes.

LABORATORIO

A continuación, se detallan las pruebas bioquímicas que permiten evaluar el metabolismo de los Hidratos de carbono:

1. **Glucemia en Ayunas**
2. **Glucemia al Azar**
3. **Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG)**
4. **Hemoglobina Glicosilada (HbA1c)**

1. **Glucemia en Ayunas:** representa la concentración de la glucosa en sangre en condiciones basales.
2. **Glucemia al Azar:** representa la concentración de la glucosa en sangre en cualquier momento del día (fuera del estado basal).
3. **Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG):** Es una prueba dinámica que consiste en monitorear la metabolización de la glucosa frente a una sobrecarga de solución glucosada en condiciones estandarizadas. Es más sensible y específica que la *Glucemia en Ayunas* para el diagnóstico de los *Estados Hiperglucémicos*, como *DM* y *Tolerancia Alterada en Ayunas (TGA)*

*Dentro de las pruebas dinámicas que evalúan la metabolización de la glucosa frente a la sobrecarga de solución glucosada, se encuentra la **Curva de Tolerancia a la glucosa (CTG)**, además de la **Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG)**. Siendo la diferencia entre ambas "el tiempo y número de extracciones", en la primera **CTG** se realizan determinaciones seriadas de *Glucemia* a los tiempos 0 (en ayunas) a los 30, 60, 90 y 120 minutos; y en la segunda **PTOG** las determinaciones de *Glucemia* se realizan en dos tiempos: 0 (ayunas) y 120 minutos post carga de una solución glucosada; siendo esta última **PRUEBA**, la de uso frecuente en la práctica clínica.*

4. Hemoglobina Glicosilada (HbA1c):

Es la heteroproteína del eritrocito que resulta de la unión de la hemoglobina (Hb) con glúcidos unidos a cadenas carbonadas. Representa una valoración aproximada de los *niveles de la glucemia en los últimos 3 meses* debido al tiempo de vida media del eritrocito y a la exposición de la hemoglobina intraeritrocitaria a los niveles de hiperglucemia.

ETAPA PRE ANALÍTICA

Las **Instrucciones** que debe cumplimentar el paciente para la realización de las *Pruebas bioquímicas*, deben ser entregadas en formato escrito redactadas en lenguaje claro, sencillo y ser explicadas en forma verbal, por el profesional bioquímico, al momento de dar el turno; a continuación se describen.

1. Glucemia en Ayunas:

Instrucciones

a. Requisitos que deberá cumplir el paciente:

El día anterior cenar de manera habitual a una hora determinada, para lograr un ayuno de 8 horas. **NO** ingerir ningún tipo de alimento y/o infusión después de la cena, únicamente podrá beber agua.

No modificar las actividades y la alimentación cotidiana, días previos a la prueba.

b. Consideraciones en el día del turno de la prueba

Concurrir al laboratorio en *Condiciones Basales** entre las 7 y las 9 horas.

**Condiciones Basales: Ayuno de 8hs y post-descanso nocturno, no realizar ninguna actividad física (Ej: ir al banco y/o compras)*

2. Glucemia al Azar:

El paciente no cumple con ningún requisito previo a la toma de muestra; la extracción sanguínea se realiza en cualquier momento del día, fuera del estado basal.

Para interpretar los resultados tener en cuenta "hora de la toma de muestra y horario de la última ingesta".

3. Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG)

Frente a la solicitud de **PTOG**, se deberá en primer lugar indagar sobre los antecedentes personales, familiares y conocer los valores de *Glucemia en Ayunas*. La *PTOG* se recomienda realizar en todas las personas que presenten factores de riesgo y/o *Glucemia en Ayuna Alterada (GAA)*.

Instrucciones para la realización de la Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG).

a. Requisitos que deberá cumplir el paciente, previamente a la PTOG

1. No modificar las actividades habituales, durante los 4-5 días previos a la prueba.
2. Los tres días previos a la prueba deberá respetar las comidas: desayuno, almuerzo y cena, incluyendo pan, mermeladas, azúcar, harinas, fideos, arroz, papa y frutas en cada comida.
3. Comunicar al profesional del laboratorio la *medicación* que recibe.
(Algunos medicamentos modifican el metabolismo: p ej. Corticoides).
4. No deberá presentar ninguna situación de estrés psíquico y/o físico como fiebre, enfermedades infecciosas, vómitos, diarreas.
5. No deberá realizar régimen para adelgazar en los días previos.
6. El día anterior a la extracción deberá cenar de manera habitual a una hora determinada de manera de lograr un ayuno de 8 horas. Podrá beber sólo agua sin ingerir ninguna otra infusión (mate, tereré)
7. Concurrir al laboratorio en *condiciones basales* para la extracción de sangre.

b. Consideraciones a tener presente durante la realización de la PTOG

1. El tiempo que permanecerá en el laboratorio durante la prueba es de 2,5 a 3 h.
2. Permanecerá sentado, sin fumar o ingerir alimentos durante la prueba.
3. La prueba debe iniciarse entre las 07:00 y 09:00 h am.
4. Al ingresar al laboratorio, descansará 15 min., y se procederá a realizar la primera extracción sanguínea (*Glucemia ayuna*)
5. En caso de que el valor de *Glucemia ayuna* sea ≥ 126 mg/dl no se continuará la prueba.
6. Luego tomará la *Solución glucosada* en 5 min. aproximadamente.
7. A las dos horas del inicio de la ingesta, se le realizará la segunda extracción (120 min).
8. En caso de náuseas o vómitos durante la prueba, la misma debe ser suspendida.

Nota: Solución glucosada al 20 %: según edad del paciente

Adultos-embarazadas-niños con peso Corporal > a 30 Kg: disolver 75grs de glucosa anhidra en 375 ml de agua.

Niños con peso Corporal < a 30 kg se utilizará 1,75grs/kg de peso (sin exceder 75grs) disuelta en agua.

4. Prueba Hemoglobina Glicosilada: esta Prueba puede realizarse como parte

4.1 De un Laboratorio programado: el paciente debe respetar las condiciones Basales

4.2 De un laboratorio de Urgencia^(*): el paciente no cumple con ningún requisito para la toma de muestra

^(*) Prueba utilizada como buen marcador para avalar DM en pacientes con hiperglucemia en los Servicios de Urgencia.

Su valor no posee variación circadiana y no está influenciada por la falta de ayuno.

Muestras biológicas a utilizar en cada Prueba.

Es importante saber que la tasa de glucólisis en una muestra de sangre in vitro, varía en 5 - 7 % promedio (aproximadamente 10 mg/dl/h), siendo responsable la temperatura, el recuento de leucocitos, eritrocitos y tiempo de exposición a estos factores. Para minimizar el consumo de la glucosa por las células, utilizar:

- **Plasma** obtenido con EDTA-fluoruro como anticoagulante, debido a su acción antiglucolítica “muestra de elección”
- **Suero**** obtenido con tubos primarios con Geles “considerando una centrifugación inmediata de la muestra, de tal manera que el gel separe el suero del paquete celular”

Glucemia en Ayunas; Glucemia al Azar; Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG):

- ✚ Plasma (obtenido con EDTA-F) o
- ✚ Suero** (es la muestra más utilizada en la rutina)

Prueba Hemoglobina Glicosilada:

- ✚ Sangre entera (obtenida con el anticoagulante EDTA)

ETAPA ANALÍTICA

A. GLUCEMIA, determinación realizada en:

- 1. Glucemia en Ayunas**
- 2. Glucemia al Azar**
- 3. PTOG**

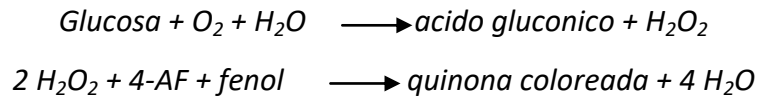
Las metodologías analíticas más utilizadas para la determinación de **GLUCEMIA** son, de:

- *Punto Final Colorimétrico Enzimático “Glucosa oxidasa”*
- *Cinética Enzimática “Hexoquinasa”*

Los procedimientos dependiendo de la capacidad operativa del laboratorio pueden ser manuales o automatizados. A continuación, se detallan los fundamentos de cada uno de las metodologías.

Método de punto final colorimétrico enzimático “Glucosa Oxidasa”

Fundamento: La glucosa presente en la muestra del paciente se pone en contacto con una solución de *glucosa oxidasa* dando lugar a ácido glucónico y agua oxigenada. El agua oxigenada en presencia de 4-aminofenazona y fenol genera una quinona coloreada que puede leerse en espectrofotómetro a 505 nm.



Método cinético enzimático “Hexoquinasa”

Fundamento: La glucosa es fosforilada por la hexoquinasa (HK) en presencia de adenosina trifosfato (ATP) e iones de magnesio para producir glucosa-6-fosfato (G-6-P) y adenosina difosfato (ADP). La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) oxida específicamente G-6-P a 6-fosfogluconato con la reducción consiguiente de dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) a dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH). Se produce 1 micromol de NADH por cada micromol de glucosa consumida. El NADH producido absorbe luz a 340 nm y puede detectarse espectrofotométricamente como un incremento de la absorbancia.

B. HEMOGLOBINA GLICOSILADA:

La SAD, sugiere una elección de método adecuado (certificado por NGSP, CV intraensayo < 5% y sesgo respecto al HPLC < 5%), que presente una buena trazabilidad respecto al método de referencia de la IFCC.

Unidades de Medida: según recomendaciones internacionales, deben ser informados de manera simultánea en unidades IFCC (mmol/mol) y en unidades NGSP (%) con un decimal, utilizando la llamada ecuación maestra IFCC -NGSP.

Para calcular el equivalente en unidades IFCC (mmol/mol) partiendo de unidades NGSP/DCCT (%). IFCC (mmol/mol) = (NGSP % - 2,15 / 0,915) x 10.

Valores de Referencia del NGSP: 4 – 5.6 %

Ventajas y Desventajas del Dosaje de la HbA1C

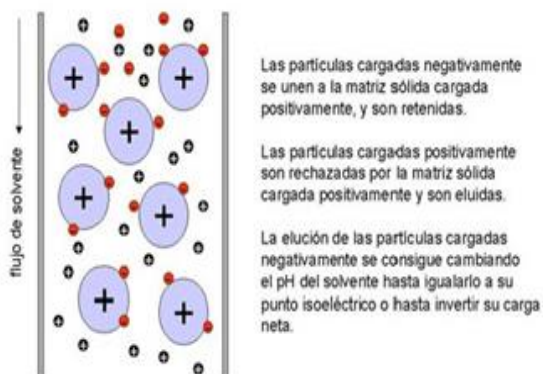
Ventajas	Desventajas
No requiere ayuno. Refleja la glucemia de los 3-4 meses previos. No se afecta por enfermedades agudas. < Variabilidad biológica intraindividual en referencia a la glucosa Permite Diagnóstico y control de DM	Mayor Valor erróneo por hemoglobinopatías, anemia o IR. Mayores diferencias entre laboratorios, que con glucemia basal. Mayor Costo. Antirretrovirales: disminuyen 1% el valor de la HbA1c. Africanos y caribeños tienen 0,4% más que los europeos.

En el 2008 el comité de expertos en DM, constituido por la ADA, ALAD, IDF y EASD, recomienda el uso HbA1c como nueva herramienta diagnóstica de DM y del Estado Prediabético, en virtud de los avances en la instrumentación, estandarización y precisión en su medición.

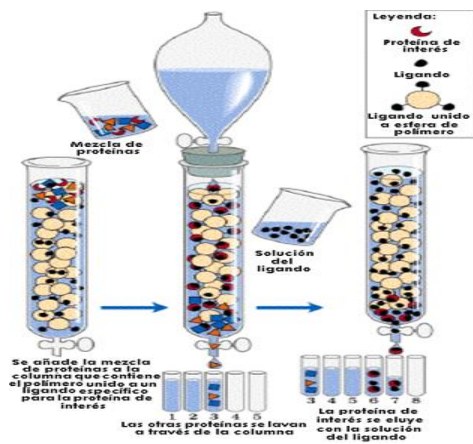
Metodologías y Fundamentos de dosaje de HbA 1c:

1. **Inmunoturbidimétricos:** basados en reacciones inmunológicas. Consisten en la valoración de la disminución de la potencia radiante, de una emisión policromática, al atravesar una solución de partículas (inmunocomplejos), medida en la misma dirección en que es emitida (es decir, el emisor y el detector están a 0°). Dicha disminución es debida a procesos de absorción, dispersión y reflexión. Los métodos Inmunoturbidimétricos son reconocidos internacionalmente como equivalentes al **método HPLC**, según el NGSP.
2. **Electroforesis:** Se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.
3. **Isoelectroenfoque:** Consiste en la separación de los componentes de la hemoglobina en un gradiente de pH superficial formada dentro de un gel de poliácridamida. Después de la separación de las bandas se corta el gel y se eluye las bandas en el buffer de un día para otro la mezcla en un rodillo. Las concentraciones de hemoglobina son entonces medidas por su absorción a 415 nm.
4. **Cromatografía:** Técnica de separación de sustancias que se basa en las diferentes velocidades con que se mueve cada una de ellas a través de un medio poroso arrastradas por un disolvente en movimiento.

PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO



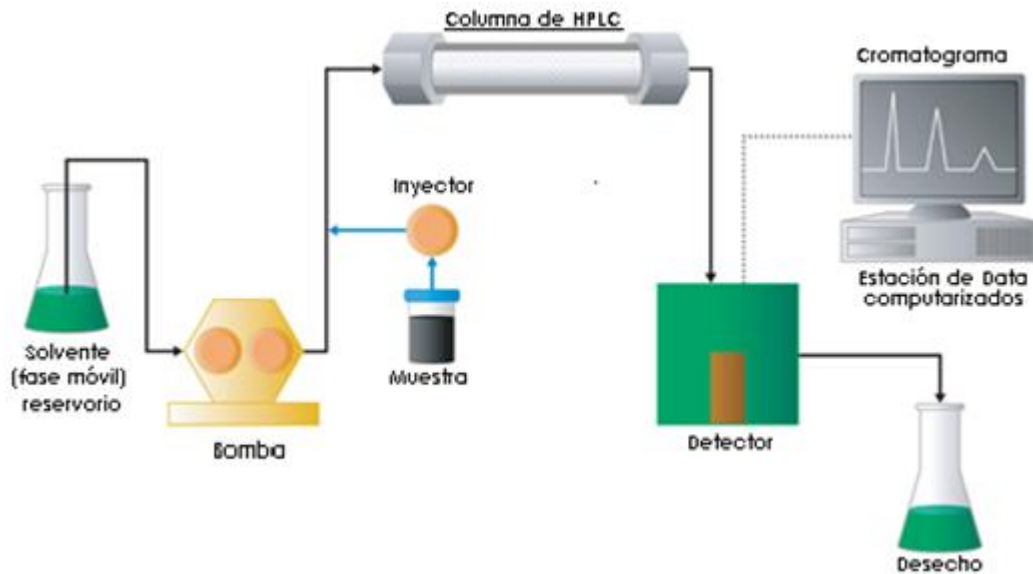
α -De intercambio iónico: Este método permite la separación de iones y moléculas polares, basado en las propiedades de carga de las moléculas y consiste en la elución diferencial de la hemoglobina glicosilada por el cambio de carga producido en la molécula debido a la glucosilación del amino terminal de la cadena.



b- Cromatografía de afinidad: método se basa en la capacidad del ácido fenilborónico en solución alcalina de unirse con grupos cis-diol coplanares. Usualmente miden hemoglobina glicosilada total y se calcula la fracción A1c basado en una correlación realizada por el fabricante.

5. High performance liquid chromatography (HPLC): Llamada Cromatografía Líquida de Alta eficacia o Cromatografía Líquida de Alta Presión. Utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Consiste en hacer pasar a la hemoglobina glicosilada por la columna cromatográfica (de vidrio) a través de la fase estacionaria, mediante el bombeo de líquido, a alta presión a través de la columna. Esta muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. Su objetivo es aumentar la eficiencia en las separaciones, es decir el tamaño de las partículas de la fase fija va disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, generando por ende la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil.



ETAPA POST ANALÍTICA

Una vez realizadas las determinaciones, se debe proceder a interpretar los resultados teniendo en cuenta *los valores de referencia (V.R)*, y consecuentemente validar el resultado.

Los *V. R. de Glucemia*, varían según la edad del paciente, *Tabla 1*

Tabla 1. Valores de Referencia según Grupo Etario.¹

En ayunas	Intervalo (mg/dl)	Intervalo (mmol/l)
Cordón umbilical	45 a 96	2,50 a 5,33
Prematuros	20 a 60	1,11 a 3,33
Recién nacidos	30 a 60	1,67 a 3,33
Recién nacidos, 1 día	40 a 60	2,22 a 3,33
Recién nacidos, > 1 día	50 a 80	2,78 a 4,44
Niños	60 a 100	3,33 a 5,55
Adultos	70 a 105	3,89 a 5,83

¹Ref: Laboratorios ABBOTT – Hexoquinasa

En la Práctica Clínica, los *V. R. de Glucemia* en pacientes adultos están definidos por estudios multicéntricos y aceptados por las distintas Asociaciones Internacionales, y son:

- Pacientes con factores de riesgo: 70-100 mg/dl
- Pacientes sin factores de riesgo: 70 -110 mg/dl¹

¹ Guía de Práctica Clínica Nacional sobre Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la DM Tipo 2 para el primer nivel de atención. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Según consenso del Ministerio de Salud de la Nación.

Por tanto en pacientes adultos frente a un informe de resultado de *Glucemia*, podemos estar frente a las siguientes *interpretaciones clínicas bioquímicas (a,b,c)*

- a) **Hiperglucemia:** valor > al límite superior del V.R. (valor > 110 mg/dl). Ej. Glucemia: 135 mg/dl
- b) **Hipoglucemia:** valor < a límite inferior del V.R (valor < 70 mg/dl). Ej. Glucemia: 35 mg/dl
- c) **Normoglucemia:** dentro del rango de V.R (valor entre 70-100 mg/dl). Ej. Glucemia: 85 mg/dl.

Para definir/diagnosticar los **Estados Hipeglucémicos (EH)** como:

- **Diabetes Mellitus**
- **Glucemia en Ayunas Alterada (GAA)**
- **Tolerancia Alterada a la Glucosa (TAG) o / intolerancia a la glucosa oral (IGO)**

Los EH “GAA y TAG”, son considerados como *Prediabetes*

Las Asociaciones internacionales ADA, ALAD, OMS y la SAD, establecieron **Criterios**

Diagnósticos en las diferentes *Pruebas Diagnósticas*, que permiten:

Diagnóstico de DM en un paciente, si se cumplen algunos de los tres **Criterios diagnóstico** establecidos en *Tabla 2*.

Tabla 2. Criterios Diagnóstico de DM

1. Dos **Glucemias en Ayunas** con valores \geq a 126 mg/dl, realizadas en 2 oportunidades con diferencia entre 5-7 días.
2. Síntomas de DM poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso + **Glucemia al Azar** \geq a 200 mg/dl.
3. **Glucemia a los 120 minutos \geq a 200 mg/dl**, post sobrecarga de solución glucosada (PTOG).
4. Valores de **Hemoglobina Glicosilada (HbA1c) \geq 6.5 % (*)** en 2 ocasiones diferentes.

Diagnóstico de Prediabetes: GAA, TAG en un paciente, si se cumplen los **Criterios diagnóstico de la Tabla**

Tabla_3. Diagnóstico de Pre-diabetes

Paciente con GAA (Glucemia en ayunas Alterada)

- *Glucemia en ayuna: entre 110-125 mg/dl, y*
- *Glucemia a los 120 minutos < a 140 mg/dl, después de una sobrecarga de solución glucosada (PTOG normal).*

Paciente con TGA/IGO (Tolerancia Alterada a la Glucosa)

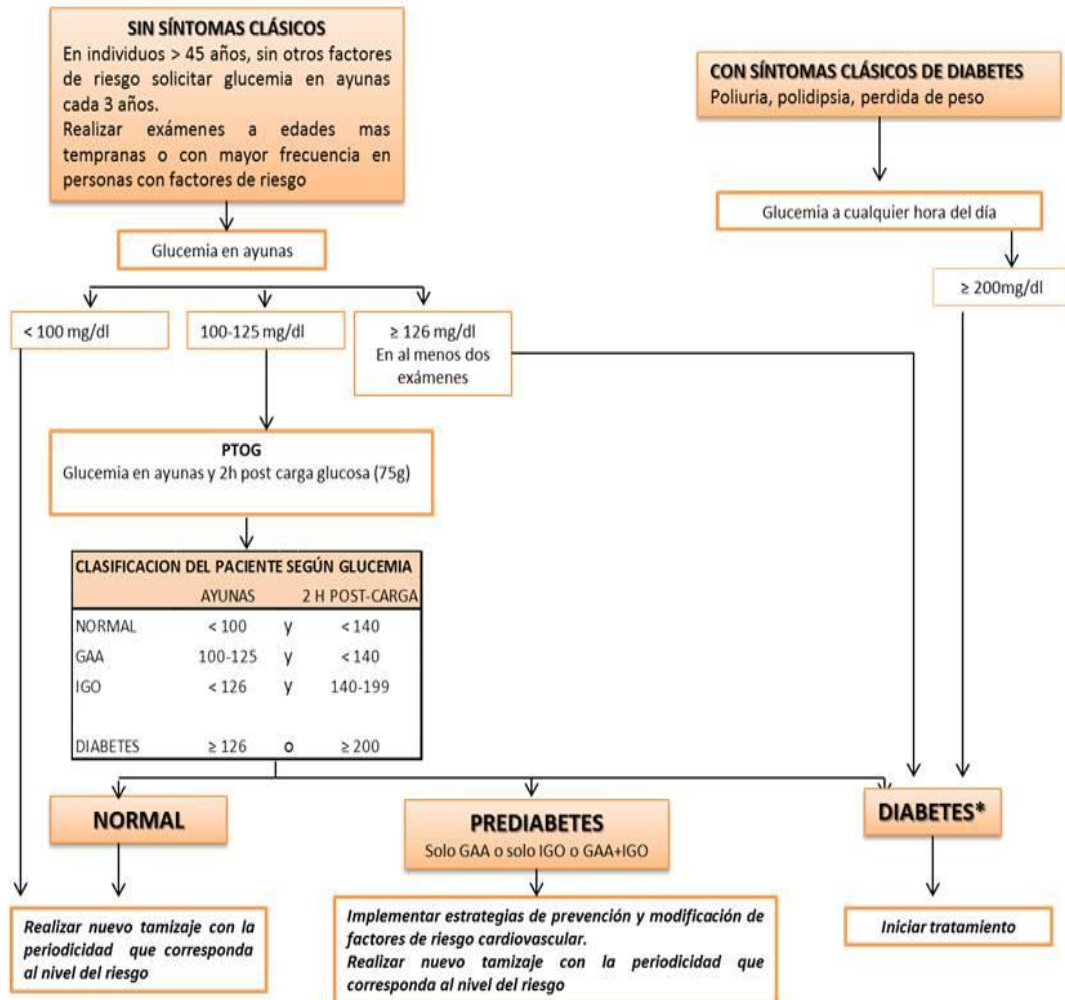
- *Glucemia en ayuna: \leq a 126 mg/dl, y*
- *Glucemia a los 120 minutos entre 140 -199 mg/dl, después de una sobrecarga de solución glucosada (PTOG).*

Según valores de HbA1c

Valores de Hemoglobina Glicosilada (HbA1c): 5,7% - 6,4%.

Fig 1. Algoritmo diagnóstico de DM

*Confirmar con pruebas de laboratorio en aquellos casos que no hay síntomas clásicos o descompensación metabólica inequívoca



Para realizar el diagnóstico de DM solamente se pueden utilizar los métodos de laboratorio para medir la glucemia, y **NO** los dispositivos/Métodos rápidos (Point Of Care)

Las *Pruebas Diagnósticas* deben considerarse en todos los adultos con sobrepeso (IMC \geq 25Kg/M² o \geq 23Kg/M² si hablamos de la población asiática) y tengan alguno de los siguientes *Factores de Riesgo*:

- Inactividad Física
- Familiares de primer grado con DM
- Pertenezcan a etnias/razas de elevado riesgo, como africanos, latinos, asiáticos.
- Mujeres con antecedentes de partos con hijos macrosómicos (peso al nacer \geq 4Kg) o historia clínica de diagnóstico de Diabetes Gestacional
- Hipertensión (\geq 140/90 mmhg o en tratamiento para la hipertensión)
- Valores de Colesterol HDL $<$ 35 mg/dl y/o Triglicéridos $>$ 250mg/dl
- Mujeres que padezcan el Síndrome de Ovario Poliquístico
- Valores de HbA1c \geq 5,7%, GAA o TAG/IGO en pruebas anteriores
- Otras condiciones clínicas asociadas a insulinoresistencia, como obesidad severa o acantosis nigricans.
- Historia de enfermedad cardiovascular

Ref: Diabetes Care Volume 38, Supplement 1, January 2015

En todos los pacientes, se deben realizar las pruebas para detectar DM T2 a partir de los 45 años. *Si los valores de las pruebas son normales*, se recomienda repetir en intervalos de tres (3) años como mínimo, aunque se debe considerar aumentar su frecuencia, por ejemplo, realizar controles todos los años, dependiendo de los resultados iniciales.

En niños (edad \leq 18 años) asintomáticos, se deben tener en cuenta los siguientes criterios:

- *Sobrepeso (IMC por encima del percentilo 85 para sexo y edad; peso o altura por encima del percentilo 85 o peso mayor a 120% del peso ideal).*
- Y dos o más de los siguientes *Factores De Riesgo*:

- Historia familiar de DM T2 en familiares de primer o segundo grado.
- Raza o Etnia.
- Signos de resistencia a la insulina o condiciones asociadas (acantosis nigricans, HTA, dislipemia, ovario poliquístico o bajo peso al nacer para la edad gestacional).
- Historia materna de DM o DMG durante la gestación del niño.

Ref: Diabetes Care Volume 38, Supplement 1, January 2015

Como vimos las Pruebas de *Glucemias en ayuna y/o Glucemia al azar*, pueden evidenciar, claramente dos alteraciones del metabolismo de los HC:

I: Hiperglucemias

II: Hipoglucemias

I: Hiperglucemias, tener presente que **NO** necesariamente son debidas a los **EH**, sino pueden observarse en otras situaciones, descritas a continuación:

- ***Hiperglucemia por no cumplimentar con el ayuno solicitado para las pruebas.***
- ***Hiperglucemia en cualquier momento del día, post ingesta de alimentos.***
- ***Hiperglucemia por estrés: definida como aquella situación que se da por un desequilibrio en las concentraciones de las hormonas contraregulatoras (glucagón, hormona de crecimiento, catecolamina y glucocorticoides endógenos o exógenos), y se presentan en diferentes situaciones clínicas, como: Infecciones, Procesos quirúrgicos, Politraumatismo, otros***
- ***Hiperglucemia en pacientes internados, con apoyo alimenticio excesivo, sobre todo intravenoso.***
- ***Hiperglucemias en pacientes Diabéticos con Descompensaciones Agudas: Cetoacidosis Diabética (DM tipo1) y Estado Hiperosmolar Hiperglucémico (DM tipo 2)***

II: Hipoglucemias

- ***Hipoglucemias en pacientes diabéticos con Descompensación aguda "Hipoglucemia"***
- ***Hipoglucemia por ayuno o intoxicación alcohólica***
- ***Hipoglucemia por enfermedades Endocrinas (Insulinoma)***

EL LABORATORIO en el CONTROL y SEGUIMIENTO de PACIENTES con DIABETES

El control metabólico del paciente Diabético mediante las pruebas de laboratorio, tiene como objetivo monitorear el metabolismo de los HC y lípidos, con el fin de mantenerlos dentro de rangos aceptables, mediante el tratamiento (actividad física, alimentación y farmacológico), y así evitar las complicaciones agudas, y/o disminuir la incidencia y progresión de las complicaciones crónicas Microvasculares y Macrovasculares, al combinar con el control de la presión arterial y las medidas antropométricas relacionadas con la obesidad, que contribuyen a establecer el riesgo de desarrollar complicaciones crónicas.

Para lograr un buen **Control de la DM** se deben alcanzar metas establecidas para cada uno de los *parámetros bioquímicos evaluados*.

Las pruebas de Laboratorio, que se utilizan en el Control de pacientes Diabéticos, están agrupadas según que evalúan, así:

1. CONTROL DEL METABOLISMO DE LOS HC:

- *Glucemia*
- *HbA1c*
- *Fructosamina*

2. CONTROL DEL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS

Perfil lipídico:

- *Colesterol total*
- *HDL-colesterol*
- *LDL-colesterol*
- *Triglicéridos*
- *Lipidograma.*

3. CONTROL DE LA FUNCIÓN RENAL:

Perfil Renal:

- *Uremia*
- *Creatininemia*
- *Proteinuria*
- *Albuminuria*

1. CONTROL DEL METABOLISMO DE LOS HC

Según las recomendaciones de la ADA del año 2014, se pueden realizar, mediante el:

- a) Automonitoreo**
- b) Monitoreo por el laboratorio**

a) Automonitoreo:

Se realiza utilizando tiras reactivas y un glucómetro (Point off care), mediante punción capilar, permite conocer el comportamiento de la glucemia a lo largo del día. Su resultado se suele identificar como “glucometría” para diferenciarlos de la glucemia medida en el laboratorio. Es fundamental la educación y entrenamiento del paciente para el presente método, a fin de evitar valoraciones erróneas.

Se recomienda hacer glucometrías (pre y/o postprandiales), las que son definidas por el profesional médico, con el registro diario, indicando horario, valor y situación particular si la hubiese.

b) Monitoreo por el Laboratorio

Pueden darse a través de:

- b.1 Glucemia en ayunas, Glucemia Pre Prandial, Glucemia Post prandial:
- b.2 *Hemoglobina glicosilada (HbA1c)*
- b.3 *Fructosamina.*

La *Hemoglobina glicosilada (HbA1c)* y *Fructosamina*, son proteína glicosiladas.

b.1 Glucemia en ayunas, Glucemia Pre Prandial, Glucemia Post Prandial:

En cada prueba, se realiza el dosaje de Glucemia con las mismas consideraciones de: tipo de muestra metodologías, descritas con anterioridad.

En las pruebas de **Glucemia Pre Prandial y Post Prandial**, los horarios de su realización son definidas por el médico, y estos deben ser expresado en el informe del resultado.

Los valores que definen buen **Control Metabólico de los HC** para la mayoría de los adultos con DM, son los establecidos en la *Tabla N° 4*:

Tabla N° 4: Valores de Buen Control metabólico de HC

Parámetros	Valor aceptable	Unidades
Glucemia en ayunas y preprandial	70-130	mg/dl
Glucemia postprandial	< 180	mg/dl

b.2 Hemoglobina glicosilada (HbA1c)

Los estudios Diabetes Control and Complications Trials (DCCT) y United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) mostraron la importancia de su uso en el seguimiento y control de la DM tipo 1 y 2.

Su uso en el monitoreo del control del metabolismo de la glucosa, en pacientes diabéticos, nos permite obtener una valoración aproximada de los niveles de la glucemia en los últimos 2-3 meses debido al tiempo de vida media del eritrocito y a la exposición de la hemoglobina intraeritrocitaria a los niveles de hiperglucemia, es importante tener presente que la concentración de la HbA1c, no presenta variaciones circadianas.

La HbA1c es una prueba con elevada especificidad, sus valores son suficientemente sensibles y predictivos ya que presentan una buena correlación con la exposición a la hiperglucemia crónica y con la aparición de las complicaciones al largo plazo.

Se recomienda la determinación de HbA1c al menos dos veces al año en pacientes con DM que han conseguido los objetivos de buen control metabólico con el tratamiento, y cuatro veces al año en pacientes en los que ha habido cambios de tratamiento o no están en objetivos glucémicos.

Existe una relación directa entre el porcentaje de la HbA1c y el promedio de la Glucemia de los últimos 2 a 3 meses llamada glucemia media estimada” o “glucemia promedio estimada” o A1C-Derived Average Glucose (ADAG). *Tabla 5*

Tabla 5. **Correlación entre Concentración de HbA1c y la glucemia media.**

HbA1c (%)	Glucemia media (mg/dl)
6	126
7	154
8	183
9	212
10	240
11	269
12	298

Estudio Internacional A1C-Derived Average Glucose (ADAG). Aceptada por ADA 2014

Y en cuanto a los objetivos del buen Control Metabólico de los HC por HbA1c, las recomendaciones para la mayoría de los adultos con DM son:

Parámetros	Valor aceptable	Unidades
HbA1c	< 7	%

b.3 FRUCTOSAMINA.

La fructosamina (FMN) son proteínas glicosiladas se forman por enlaces covalentes de la glucosa con residuos lisina de las proteínas sanguíneas, principalmente la albúmina, dando lugar a bases de Schiff que en una segunda etapa son transformadas irreversiblemente en cetoaminas o FMN. Esta reacción es dependiente de la concentración de glucemia y del tiempo de interacción con las proteínas.

La concentración de FMN en sangre, representa en forma retrospectiva una medida de la media de las fluctuaciones de la glucemia 15 – 21 días previos a la realización del análisis. Por tanto, refleja el control glucémico de las 2-3 semanas anteriores.

Por consenso, en Ginecología y Obstetricia se define estudiar FMN junto con HbA1c en Diabetes Gestacional (inicio) y cada tres semanas la FMN de acuerdo con la disponibilidad en cada centro y, sobre todo, si existen dificultades en el cumplimiento del automonitoreo glucémico. Por tanto, ha sido considerada como una prueba alternativa a la HbA1c en

aquellos casos en los cuales esta no es fiable por ejemplo para evaluar cambios rápidos del tratamiento de la *Diabetes Gestacional (DG)* (esencial durante el embarazo ya que las necesidades de la madre cambian de manera constante durante la gestación: disminución de la vida media de los hematíes, como anemia hemolítica o pérdida de sangre, presencia de variantes de hemoglobina, como en la anemia falciforme)

Se han encontrado niveles falsamente disminuidos de FMN en pacientes con niveles descendidos de albumina, en situaciones en las que existen pérdidas de proteínas por la orina o por el tracto gastrointestinal, o por alteraciones en su síntesis. En este caso se observarán discrepancias entre los resultados de FMN y los del control diario de glucosa en la sangre.

Etapa Pre Analítica

Condiciones del paciente: es una solicitud programada, y se deberá respetar las condiciones basales y ayuno de 8hs.

Muestra: Suero o plasma obtenido con anticoagulante EDTA o Heparina.

Etapa Analítica

Metodología: Método colorimétrico - cinético.

Fundamento: las proteínas glicadas séricas reducen las sales de tetrazolio (NBT) en medio alcalino, originando formazán, cuya velocidad de formación es proporcional a la concentración sérica de albumina glicada

Valores de Referencia: Hasta 285 nmol/l

Y en cuanto a los objetivos del buen control metabólico de HC por FMN las recomendaciones para la mayoría de los adultos con DM son:

Parámetros	Valor Aceptables	Unidades
FMN	< 300	nmol/l

2. CONTROL DEL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS

Perfil Lipídico: Colesterol total; HDL-colesterol; LDL-colesterol; Triglicéridos; Lipidograma.

Los controles son establecidos por el profesional médico, según el Protocolo de seguimiento en los diferentes tipos de Diabetes. (El estudio de los lípidos será visto en la Unidad de Lipoproteínas.)

3. CONTROL DE LA FUNCIÓN RENAL

Perfil Renal: Uremia, Creatininemia, Proteinuria, Albuminuria.

El protocolo de estudio, es definido por el profesional médico, según los diferentes tipos de DM, permite definir: Ausencia de daño renal, Nefropatía Incipiente o Insuficiencia Renal establecida.

Dosaje de Uremia y Creatininemia, son vistos en la *Unidad de Proteínas*

Parámetros de estudios en orina:

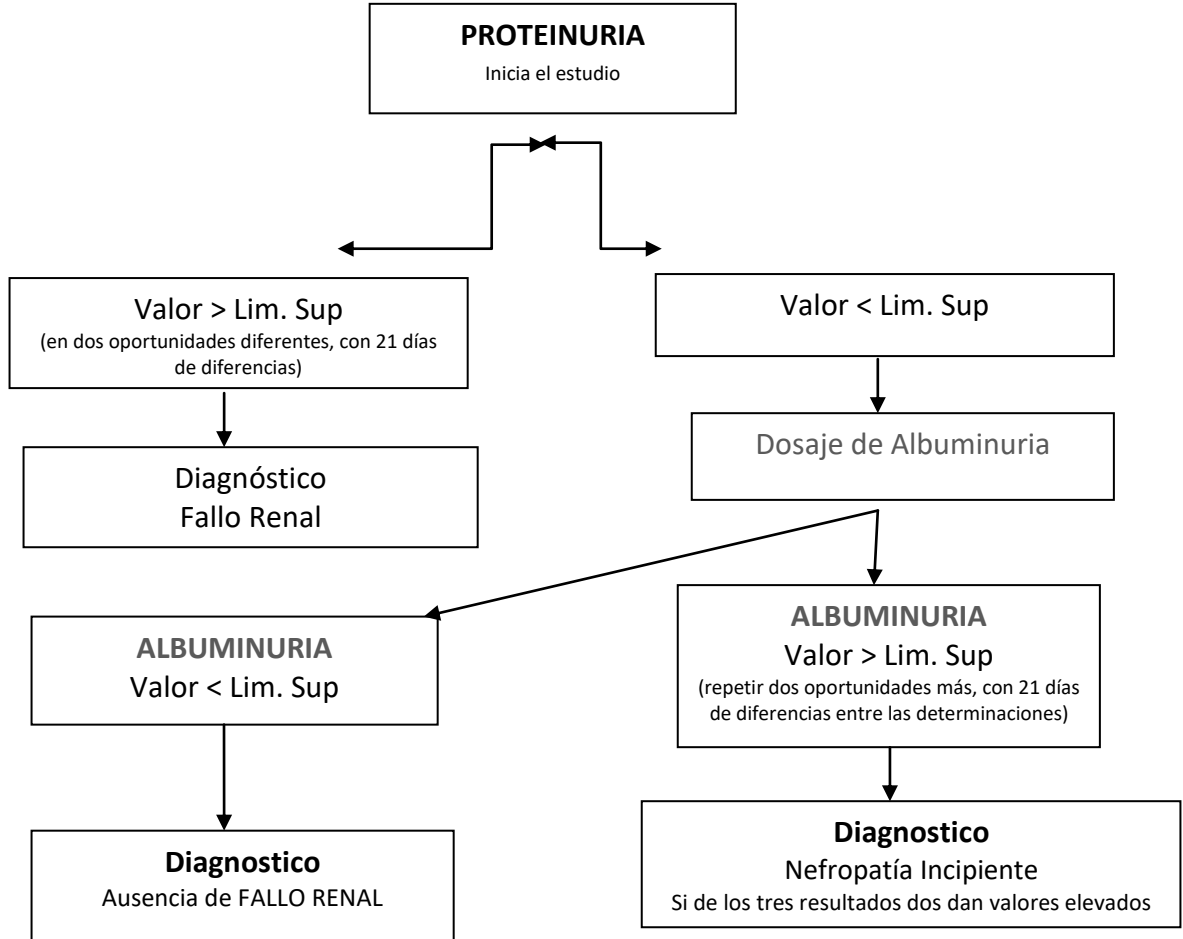
- Proteinuria de 24 hs
- Albuminuria (Microalbuminuria)

Momento de la realización de los estudios (Proteinuria-Albuminuria):

- En pacientes con DM tipo 2: se realizan al momento del diagnóstico de DM.
- En pacientes con DM tipo 1: se realizan a los 5 años del diagnóstico de DM.

Protocolo básico del estudio de proteínas en orina.

a. Se inicia el estudio con la **PROTEINURIA**.



DETECCIÓN DE DM GESTACIONAL (DG) y PRE GESTACIONAL (DPG)

Tradicionalmente, la DG ha sido definida como una alteración en la tolerancia a los hidratos de carbono de severidad variable, que comienza o es diagnosticada en el embarazo en curso. En los últimos consensos, se define dos situaciones de alteración en la tolerancia a los hidratos de carbono, y son **DM GESTACIONAL (DG) y PRE GESTACIONAL (DPG)**

Entendiéndose como **DG**, la alteración en la tolerancia a los hidratos de carbono de severidad variable, que comienza o es diagnosticada por primera vez en el segundo o tercer trimestre-del embarazo en curso. Y **DPG** como “aquella situación en la que una mujer con DM se embaraza o una embarazada cumple con los *criterios diagnósticos de DM* según la OMS durante el 1º Trimestre”

La prueba *Glucemia en Ayunas*, debe realizarse en la primera visita prenatal de todas las embarazadas con y sin **Factores De Riesgo**. Tabla N° 6

Tabla N° 6 **Factores de Riesgos de DM en embarazadas**

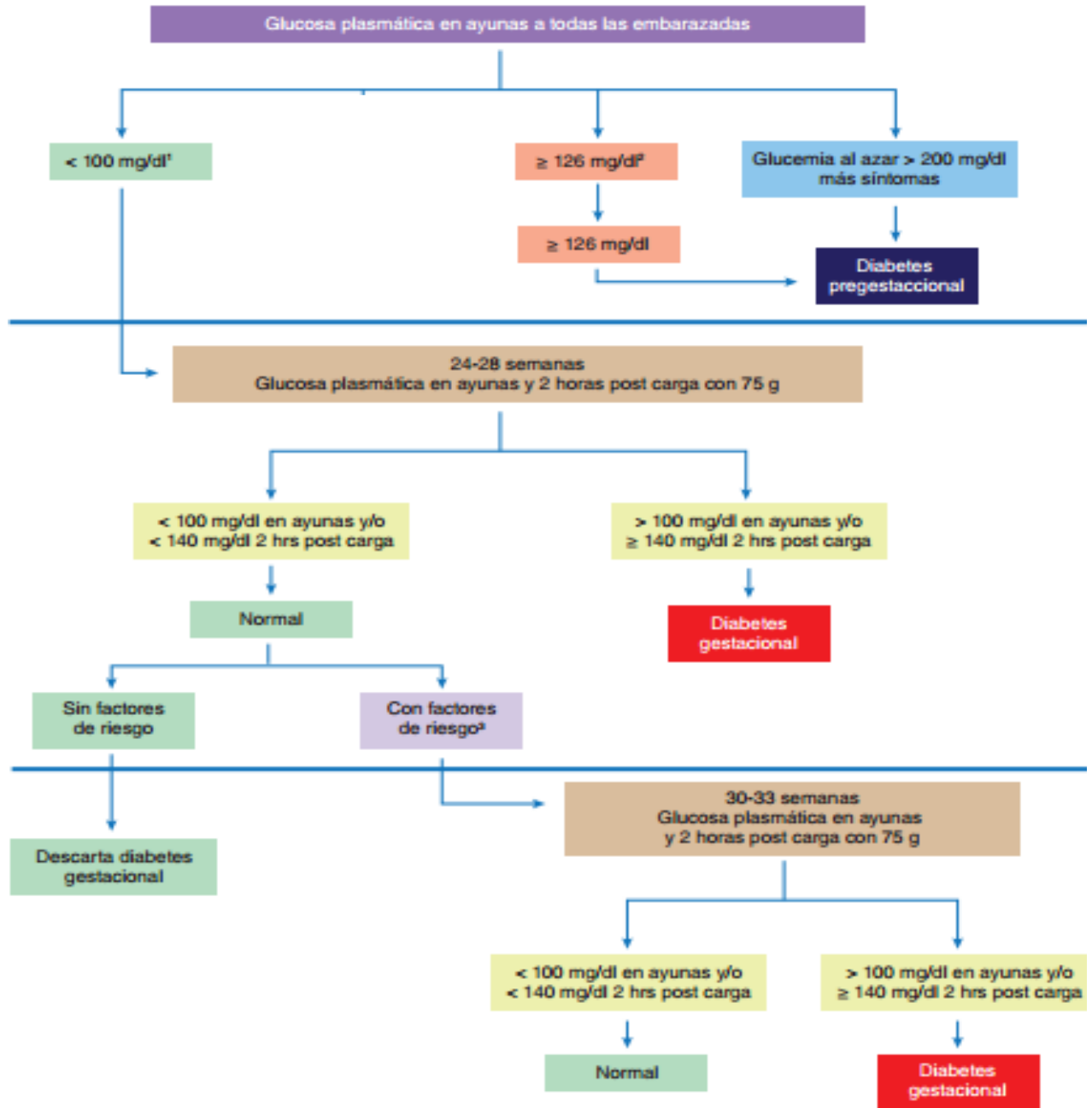
- Antecedente de DG en embarazo anterior.
- Edad mayor o igual a 30 años.
- Antecedentes de diabetes en familiares de 1º grado.
- Pacientes con índice de masa corporal de 27 o más al comienzo del embarazo.
- Antecedentes de macrosomía fetal (un hijo de 4000 gr o más).
- Antecedentes de mortalidad perinatal inexplicada.
- Síndrome de poliquistosis ovárica.
- Antecedente de la madre de alto o bajo peso al nacer.
- Glucemia en ayunas mayor de 85 mg/dl.
- Hipertensión inducida por el embarazo.
- Crecimiento fetal disarmónico con circunferencia abdominal mayor de 70 percentilo a la 28-30 semanas.
- Glucosuria positiva en la segunda orina de la mañana (con doble vaciado).
- Malformaciones congénitas.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DG

Se diagnóstica **DG** cuando la embarazada presenta:

- Dos o más *Glucemias en Ayunas* > 100 mg/dl en transcurso de la semana.
- Glucemia \geq 140 mg/dl a los 120 min post carga de solución glucosada (PTOG)

Figura N° 2. **ALGORITMO DE ESTUDIO Y DIAGNÓSTICO**



Ref. Cuadro Modificado de "ALAD Adaptado de la Guía de DM y Embarazo del Ministerio de Chile"

Notas:

- Repetir la *Glucemia en Ayunas* en un plazo máximo de siete días.
- Con respecto a la PTOG se entiende, y se debe verificar, que la dieta de una embarazada incluye buena cantidad de H de C por lo tanto si cumple con el resto de los requisitos puede realizarse al día siguiente de la solicitud médica.
- Re testear entre las 31 y 33 semanas a todas las embarazadas con factores de riesgo, priorizando a las embarazadas que presenten factores de riesgo aparecidos o desarrollados durante el embarazo. (ALAD 2016)

El diagnóstico de DG es uno de los aspectos en los que aún persiste discrepancia entre los criterios de la OMS, la ADA y diversos grupos de expertos.

La ADA permite utilizar estrategias de diagnóstico de uno y dos pasos. La OMS propone que se utilicen en la mujer embarazada los mismos criterios diagnósticos de DM que se emplean en el resto de las personas, y que toda mujer que reúna los criterios diagnósticos de TAG o DM sea considerada y manejada como DG (ver figura 2). Su valor predictivo ha sido validado principalmente con relación a la morbilidad perinatal.

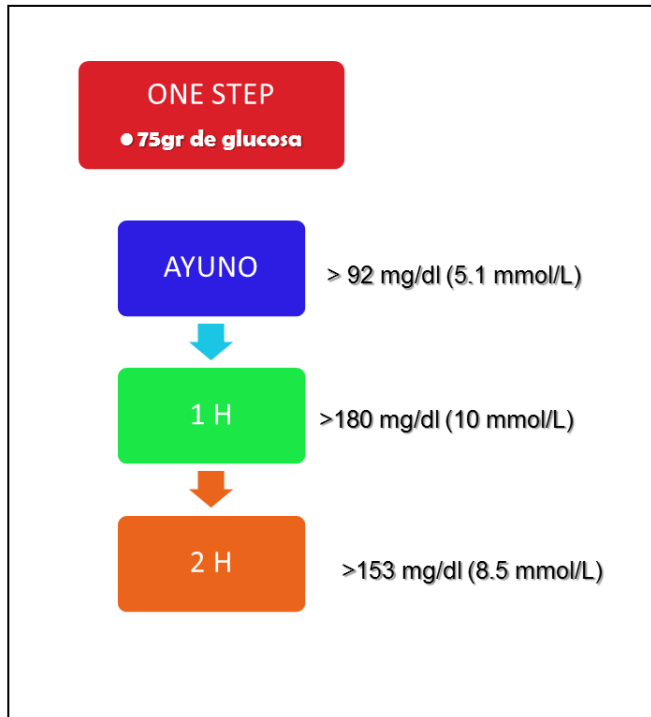
El GTDE de la ALAD ha recomendado utilizar los criterios diagnósticos de la OMS, excepto que la *Glucemia en Ayunas* se considera diagnóstica de DG si es igual o superior a 105 mg/dl en dos o más ocasiones. Si el valor de este estudio es menor de 105 mg/dl, se sugiere realizar una carga de 75 g de glucosa y se confirma el diagnóstico cuando a los 120 minutos post carga presenta un valor \geq de 140 mg/dl; este criterio fue aceptado por la SAD.

Estrategias de diagnóstico:

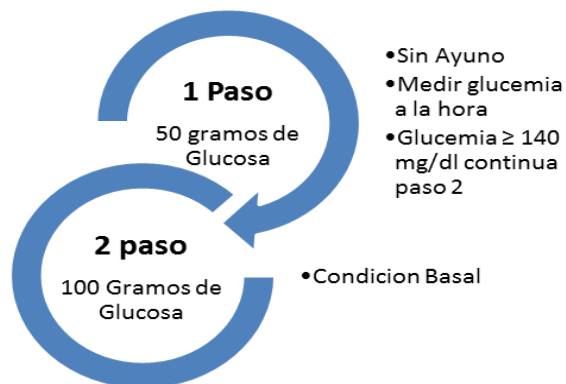
“One Step” o en un solo paso: se realiza un PTOG con sobrecarga de 75gr de glucosa en solución, midiendo los valores de glucemia en el tiempo 0 (ayuno), a la hora y a las dos horas post carga, en la semana 24-28 de gestación en todas aquellas mujeres que no se saben diabéticas.

La OMS en cambio difiere en el criterio diagnóstico ya que utiliza únicamente el valor basal y el de los 120 minutos, con un punto de corte de 140 mg/dl:

“Las gestantes que cumplen los criterios OMS para DM o TAG clasifican con DG”. Criterio basado en estudio HAPO realizado por IADPSG (International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group).



“Two-Step” o en dos pasos: en un primer paso se debe realizar una sobrecarga con 50gr de glucosa (en 200 ml de agua) y se mide el valor de glucemia a la hora, en todas las embarazadas entre 24-28 semanas de gestación que no se saben diabéticas. Este procedimiento no requiere ayuno. Si los niveles de glucemia son ≥ 140 mg/dl se debe proceder a realizar *un segundo paso*, que consiste en una PTOG con 100 gr de glucosa (en 400 ml de agua), en condiciones basales. El diagnóstico de DMG se hace si los valores de glucemia son \geq en al menos dos de las siguientes cuatro posibilidades.



	Carpenter/Coustan	or	NDDG
Fasting	95 mg/dL (5.3 mmol/L)		105 mg/dL (5.8 mmol/L)
1h	180 mg/dL (10.0 mmol/L)		190 mg/dL (10.6 mmol/L)
2h	155 mg/dL (8.6 mmol/L)		165 mg/dL (9.2 mmol/L)
3h	140 mg/dL (7.8 mmol/L)		145 mg/dL (8.0 mmol/L)

En la actualidad, existe un intenso debate sobre los **Criterios Diagnósticos de la DG**, siendo los más utilizados:

- **DG** si su valor es ≥ 140 mg/dl a las 2 hs post carga de solución glucosada. *(Recomendado por la OMS y por NICE)*
- **DG** si al menos uno de los valores de la determinación de glucemia basal, 1ª y 2ª hora es \geq a lo normal.

Hay controversia **con respecto al uso de HbA1c para el diagnóstico de DG**, es decir no es una alternativa útil que reemplace a la PTOG, porque el aumento de esta podría tener más relación con el aumento de HbA1c que se presenta en pacientes con anemia que debidos a hiperglucemias. Por lo tanto, no se recomienda utilizar esta última para diagnostico durante el embarazo (ALAD 2016)

RECLASIFICACIÓN Y MONITOREO ULTERIOR

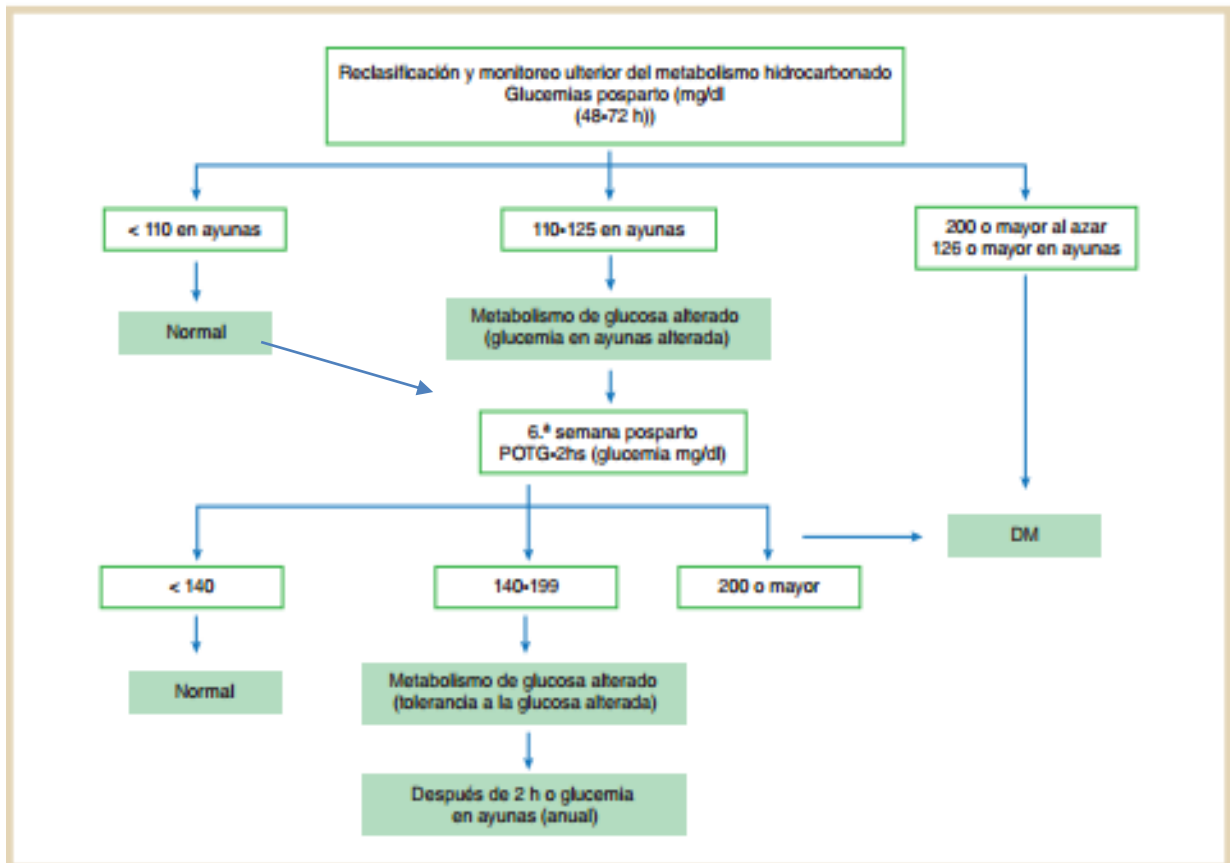
Todas las pacientes que fueron diagnosticadas con Diabetes durante el embarazo, deberán ser monitoreada **a los 45 días (6 semanas post parto)** del nacimiento, con la determinación de Glucemia *en Ayunas*, y en aquellas pacientes con resultados con valores normales durante el puerperio se recomienda *realizar una PTOG* según la metodología de la OMS *Ver algoritmo de reclasificación Fig.5*

Los resultados de esta **prueba PTOG** nos permitirán determinar las siguientes posibilidades diagnósticas en la paciente:

- Diabetes Mellitus: Glucemia a 2 h post carga de solución glucosada ≥ 200 mg/dl

- Tolerancia Alterada de la Glucosa: Glucemia a 2 h post-carga de solución glucosada 140-199 mg/dl
- **Paciente Normal:** glucemia 2 h post-carga < 140 mg/dl. Estas son las pacientes categorizadas con **DG**, las que deben ser controladas durante toda la vida para detectar el desarrollo de DM o prediabetes al menos cada 3 años

Fig. N 5 Algoritmo de Reclasificación y monitoreo ulterior del metabolismo Hidrocarbonado



(Adaptado de las guías NICE, 2015).

PRUEBAS DE DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

Una vez diagnosticada la DM, es importante clasificar el tipo de entidad, debido a las implicaciones clínicas, pronósticas y terapéuticas, y el riesgo de desarrollar la enfermedad para los familiares directos del paciente.

EL *Diagnóstico diferencial* entre *DMT1* y *DMT2* no se fundamenta en el dosaje de insulinemia, sino que se realiza teniendo en cuenta la presentación clínica, epidemiología, evolución de la enfermedad, pero es relevante conocer los parámetros bioquímicos que pueden ser útiles en determinadas circunstancias colaborando en el diagnóstico diferencial, los cuales se detallan y se describen a continuación:

PARÁMETROS DE LABORATORIO:

Determinación del antígeno leucocitario humano (HLA).

Anticuerpos:

- Anticuerpos anti-descarboxilasa del ácido glutámico 65 (GAD-65 o GADA).
- Anticuerpos anti-células de los islotes pancreáticos (ICA).
- Anticuerpos contra el antígeno asociado al insulinoma (Antitirosinafosfatasa, IA-2A)
- Anticuerpos anti-Insulina/ proinsulina (IAA).
- Anticuerpos Zn T8: Anticuerpos Antitransportador de zinc.

Insulina y Péptido C.

ANTICUERPOS (ACS): Aparecen en el inicio de la patogenia, por tanto, son de gran utilidad como marcadores precoces de la enfermedad y pueden ser utilizados en programas de screening de la población general con el objetivo de identificar los individuos con mayor riesgo de padecerla. Sin embargo, la OMS no aconseja la medición de manera regular de *autoanticuerpos* específicos ni de péptido C para testear DMT1, pero si para ayudar a diferenciar la DMT1 de la DMT2.

ANTICUERPOS ANTI GAD (GADA): La enzima descarboxilasa de ácido glutámico sintetiza el neurotransmisor inhibitorio GABA (ácido gamma-aminobutírico) a partir del ácido glutámico. Tiene 2 isoformas: GAD 65 presente en SNC y páncreas y GAD 67 en SNC

Metodología: estos anticuerpos se pueden dosar por RBA (ensayo de unión por radioligando)

Los resultados se obtienen con un suero patrón de referencia y las unidades de expresión se informan como INR (índice numérico relativo) GAD INDEX.

También se realiza IFI convencional utilizando como sustrato células de páncreas fresco de hámster transfectadas con gen de la GAD 65 humana. Esta metodología presenta mayor sensibilidad (positividad) en aquellos pacientes con resultados negativos por RBA.

Otros: RIA (Radio inmunoanálisis). *Valor de Referencia:* 0-1 U /ml; ELISA

Utilidad: Tienen un carácter predictivo ya que constituyen los marcadores más precoces de la DMT1, detectándose entre 8 a 10 años previos al inicio de la enfermedad. No varía con la edad de los debutantes, ni decae mucho con el tiempo. La prevalencia de GAD en pacientes debutantes es del 70 al 80 %, siendo así los más empleados para el cribado inicial. Como estos anticuerpos pueden aparecer en otros desórdenes autoinmunes endócrinos, es conveniente asociarlos con otras determinaciones para utilizarlos como marcadores de DMT1. Solamente un 1% de los individuos sanos exhiben valores positivos.

Se usa para diagnóstico de DMT1 y LADA en etapas tempranas y en el diagnóstico diferencial entre la LADA y la DMT2, en adolescentes, sobre todo.

Si se combina la detección simultánea de éste con ICA y/o IAA, la sensibilidad alcanza valores superiores al 90%.

ANTICUERPOS ANTI-ISLOTE (ICA): Estos Acs reaccionan contra el citoplasma de todas las células del islote por lo tanto la especificidad es baja debido a la gran cantidad de determinantes antigénicos en la muestra de tejidos y a la naturaleza subjetiva de la metodología de IFI. La clonación de autoAcs específicos ha hecho posible el desarrollo de técnicas de detección de cada uno de ellos a través de RIA.

Metodología: Su detección se lleva a cabo por Inmunofijación Indirecta (IFI) a través de cortes de páncreas humanos frescos de grupo sanguíneo "0". Las unidades son UJDF (Unidades de las Juvenile Diabetes Foundation).

Valor de referencia: cualitativo: negativo o positivo

Cuantitativo: menor a 10 UJDF

Existen métodos alternativos recombinantes y automatizables con mayor especificidad, que los han ido reemplazando.

Utilidad: Los ICA son marcadores precoces de DMT1 y preceden en años a la aparición de los síntomas clínicos y luego de instalada la enfermedad desaparecen paulatinamente. Se

presentan en el 70-80% de los casos de diabetes de novo y prediabetes. Solo estaría indicada su realización en casos de prediabetes con negatividad de los otros anticuerpos, y para diagnóstico diferencial entre LADA y DMT2.

ANTICUERPOS ANTI-INSULINA (IAA O IA): Pueden tratarse de autoAcs IAA (se detectan antes de administrar Insulina exógena) o haloacos, IA (que aparecen post tratamiento con Insulinas incluso de alta calidad y pureza) y son indistinguibles metodológicamente entre sí. Por este motivo, una vez iniciada la terapéutica no deberían solicitarse.

Metodología: La metodología de referencia es RBA. La expresión final de los resultados se expresa en unión porcentual de la radioactividad, ligado específicamente por los anticuerpos. Se recomienda informar no solamente los títulos sino también las subclases de Inmunoglobulinas IgG y el epítipo de Insulina involucrados.

Utilidad: Este marcador se correlaciona inversamente con la edad, por lo tanto, muestran mayor prevalencia entre los pacientes que debutan a edades más tempranas, entre 5 a 10 años. Se han detectado IAA en aproximadamente un 40 a 50 % al debut de pacientes con DM T1. Usualmente, estos autoanticuerpos están presentes en la persona con LADA. Por lo tanto, se puede utilizar para el diagnóstico diferencial entre la LADA y la DMT2. Su estudio es útil en la falta de respuesta terapéutica al tratamiento con insulina. La detección de ambos marcadores (ICA e IAA) predice la insulinopenia con el subsiguiente desarrollo de DMT1 de manera más confiable que cada uno por separado.

ANTICUERPOS CONTRA EL ANTÍGENO ASOCIADO AL INSULINOMA/

(ANTITIROFINAFOSFATASA, IA2 O IA-2A) Y SU FRAGMENTO RELACIONADO (ICA512)

Dentro de los Acs anti-islole de Langerhans –ICA- se encuentran los autoanticuerpos dirigidos contra la tirosin fosfatasa 2 que es una proteína transmembrana que se expresa en los gránulos secretorios de las células beta y en células neuroendocrinas. Estos Acs se denominan IA2 y su polipéptido clivado ICA 512.

Metodología: Para la detección de anticuerpos IA2A también se utiliza RBA, agregando un sistema que codifica para la proteína tirosin fosfatasa IA-2 completa o para el dominio intracelular como el ICA 512.

Valores de referencia:

RBA: Negativo: < 1

Positivo: > 1

Otra metodología utilizada es RIA.

Valores de referencia: < 10 U /ml.

Utilidad: son los principales autoantígenos en la DMT1; el 60 – 70% de personas con DMT1 de diagnóstico reciente demuestran autoanticuerpos contra el IA-2, aunque éstos desaparecen con el tiempo. La sensibilidad y la capacidad predictiva aumenta si se los dosa en combinación con otros anticuerpos y su presencia se asocia a una progresión más rápida hacia el inicio de los síntomas clínicos de la enfermedad; generalmente es uno de los últimos AutoAcs en aparecer en la fase pre-clínica.

La utilización de estos marcadores de mayor prevalencia para la detección precoz de la enfermedad presenta una sensibilidad combinada superior al 90% y un Valor Predictivo Positivo (VPP) del 100% para que exista manifestación clínica de la enfermedad en los 5 años posteriores de su detección. El ICA512 tiene un alto valor predictivo positivo, pero baja sensibilidad.

El IA 2A también se asocia a la DM autoinmune del adulto (LADA).

ANTICUERPOS ANTI ZN-T8: El ZnT8 participa en el transporte de Zn⁺⁺ desde el citoplasma hacia el interior del gránulo de secreción de insulina. La presencia del catión es esencial para el almacenamiento de la insulina, y para la secreción de la hormona frente al estímulo de glucosa.

Utilidad: En los diabéticos este transportador presenta un polimorfismo en el residuo 325 (Arg/Trp) formando los autoAcs específicos de las células Beta.

Aunque no son de uso rutinario, su presencia se correlaciona con un incremento en la posibilidad de padecer DM1, con menos tiempo de evolución. La realización de estos marcadores es de gran interés en población no caucásica (fundamentalmente raza negra) en la que los Acs AntiGAD-65 se ha demostrado que muchas veces son negativos. En contraste con otros Acs, los anti-ZnT8 no parecen estar asociados con el antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II y, por lo tanto, podrían ser de especial valor en las personas con bajo riesgo genético. Además, a diferencia de lo que ocurre con GAD e IA-2, ZnT8 es un antígeno específico de célula beta por lo que la detección de ZnT8 pone en evidencia un daño de dichas células. Se usan como marcador adicional a GADA y IA2.

Metodología: se realiza mediante el ensayo de unión de radioligando, utilizando distintas variantes antigénicas: ZnT8-Arg325, ZnT8-Trp325, ZnT8-Arg-Trp325, ZnT8-Arg-Arg325 y ZnT8-Trp-Trp325.

El estudio conjunto de GADA+IA-2A+anti Zn T8, posee una sensibilidad del 98 %

En resumen: Actualmente, la combinación de anticuerpos GAD e IA 2A en pacientes adultos es la más utilizada, ya que permite detectar entre el 93 y 100% de diabéticos tipo 1.

Se sabe que alrededor del 90% de los niños con diagnóstico reciente de DMT1 poseen autoanticuerpos positivos para IAA, GADA, o IA-2A. Con la determinación de ZnT8 el porcentaje se incrementa aproximadamente al 96%, disminuyendo el número de casos de la denominada DM tipo 1B o idiopática.

La determinación de Anti-IAA es más útil en niños pequeños y en la falta de respuesta terapéutica al tratamiento con insulina. En pacientes pediátricos menores de 5 años la determinación de estos presenta una prevalencia del 90%, y es inversamente proporcional a la edad, raramente se detectan en adultos.

La determinación de ICA solo se realizará cuando la sospecha de DMT1 sea muy elevada y los otros marcadores sean negativos.

Los autoanticuerpos para IA-2A a menudo disminuyen después del diagnóstico y los anti-GAD tienden a persistir mayormente en el tiempo.

Una vez establecido el diagnóstico, la monitorización de la enfermedad mediante marcadores no es necesaria, ya que según avanza la enfermedad se destruyen los antígenos y los acs acaban negativizándose.

La búsqueda de los Acs puede utilizarse en:

- *Diagnóstico diferencial* entre DMT1y DMT2
- DMT2 y LADA.
- Diagnóstico precoz de Familiares de 1er grado de diabéticos insulino dependientes: Considerando que las manifestaciones clínicas aparecen en etapas avanzadas de la enfermedad cuando ya existe una destrucción de más del 90 %de las células β .

INSULINA

Metodología: ELISA, CLIA y RIA.

Valores de referencia: RIA: 70-174 pmol/L 10-25 μ U/mL y Quimioluminiscencia 2-15 uUI/ml

Utilidad e Interpretación clínica: en la mayoría de los casos el Diagnóstico diferencial entre DMT1 y DMT2 no se fundamenta en el dosaje de insulinemia, sino que se realiza teniendo en cuenta la presentación clínica, epidemiología y evolución de la enfermedad. La determinación es útil para diagnóstico diferencial de hipoglucemias debido a neoplasia de las células β de los islotes pancreáticos (insulinoma) o a utilización excesiva de hipoglucemiantes, por ejemplo. Otra situación es la evaluación de la resistencia insulínica en algunos pacientes con síndrome del ovario poliquístico, síndrome metabólico y trastornos relacionados con la hipófisis o las glándulas suprarrenales, en cuyo caso puede dosarse en conjunto glucemias e insulinemias basales y a las 120 min post carga de glucosa (PTOG).

La concentración de insulina puede estar aumentada también en embarazo, fiebre, ingestión de etanol, obesidad, edad avanzada, tabaquismo.

PÉPTIDOC

Metodología:

EIA

Valores de referencia:

- Manual Tietz (1990) 0,26-0,62 nmol/L (0,78-1,89 μ g/L)

Utilidad e Interpretación clínica: Es un mejor indicador del funcionamiento del páncreas porque tiene mayor vida media en sangre que la insulina. En general es útil para evaluar la capacidad residual de secreción del páncreas en pacientes con DM tratados con Insulina exógena, y para diferenciar las hipoglucemias causadas por administración en exceso de esta de los insulinomas. Al igual que insulina no se utiliza mucho en diagnóstico diferencial entre DMT1 y DMT2. Su concentración puede estar disminuida por el ejercicio físico, obesidad y aumentada en edad avanzada, enfermedad renal, resistencia a la insulina.

Bibliografía

1. de Diabetes, A. L. (2016). ALAD. *Guía de Diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2*, 39-42.
2. del Castillo Tirado, R. A., López, J. A. F., & del Castillo Tirado, F. J. (2014). Guía de práctica clínica en el pie diabético. *Archivos de medicina*, 10(2).
3. Mata-Cases, M., Artola, S., Escalada, J., Ezkurra-Loyola, P., Ferrer-García, J. C., Fornos, J. A., ... & Rica, I. (2015). Consenso sobre la detección y el manejo de la prediabetes. Grupo de Trabajo de Consensos y Guías Clínicas de la Sociedad Española de Diabetes. *Avances en Diabetología*, 31(3), 89-101.
4. Benzadón, M., Forti, L., & Sinay, I. (2014). Actualización en el diagnóstico de la diabetes. *Medicina (Buenos Aires)*, 74(1), 64-68.
5. Guisasaola, F. Á., Menéndez, S. A., San Martín, J. E., Jiménez, F. E., Loyola, P. E., García, J. F., ... & Cases, M. M. (2015). Consenso sobre la detección y el manejo de la Prediabetes. Grupo de Trabajo de Consensos y Guías Clínicas de la Sociedad Española de Diabetes. Consensus on the detection and management of Prediabetes. Consensus and Clinical Guidelines Working Group of the Spanish Diabetes Society. *Rev Esp Endocrinol Pediatr*, 6(1), 21-38.
6. Silvio E. I. Diagnosis of Diabetes . The new England Journal of Medicine- Reino Unido. Ago-2012. Disponible en file:///C:/Users/Usuario/Downloads/diagn%C2%A5stico_de_diabetes.pdf
7. Voto I, Nicoletti A, Salcedo L y et al .Consenso de diabetes Recopilación, actualización y recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes gestacional. Buenos Aires Sep 2012 -FASGO. Disponible en <http://www.fasgo.org.ar/archivos/consensos/diabemb.pdf>
8. De Diabetes, A. L. (2007). Consenso latinoamericano de diabetes y embarazo. *La Habana, Cuba*, 55-69.
9. Guías ALAD sobre el diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes tipo 2 con medicina basada en evidencia -Edición 2013- disponible en https://issuu.com/alad-diabetes/docs/guias_alad_2013
10. Prevención, diagnóstico y tratamiento temprano de la Nefropatía Diabética Recomendaciones de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) Avalado por la Sociedad Latinoamericana de Nefrología e Hipertensión (SLANH) –Consensos ALAD <http://alad-americalatina.org/wp-content/uploads/2016/10/PREVENCIÓN-DE-NEFROPATIA.pdf> Manual de automonitoreo de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD).
11. Consensos ALAD. <http://alad-americalatina.org/wp-content/uploads/2016/10/AUTOMONITOREO-PARA-DIABETES.pdf> figueredoc. El transportador de zinc 8: repercusiones de su polimorfismo en la diabetes tipo 2, y en las variantes tipo 1/LADA-chaco, arg 2010. Disponible en file:///C:/Users/Usuario/Downloads/transportador_zinc_y_autoanticuerpos.pdf
12. Rodbard, H. W., & Jellinger, P. S. (2012). Comment on: Inzucchi et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Patient-Centered Approach. Position Statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2012; 35: 1364–1379. *Diabetes care*, 35(10), e70-e70.
13. Ministerio de Salud -Presidencia de la Nación- Guía Práctica Clínica Nacional sobre Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la TIPO 2 MELLITUS DIABETES –Buenos Aires 2012. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000076cnt-2012-08-02_guia-breve%20-prevencion-diagnostico-tratamiento-diabetes-mellitus-tipo-2.pdf
14. KILPATRICK E, MAYLOR P, KEEVILB . Biological Variation of Glycated Hemoglobin. Implications for diabetes screening and monitoring- Reino Unido- DIABETES CARE, VOLUME 21, NUMBER 2, FEBRUARY 1998
15. Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., ... & Matthews, D. R. (2015). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care*, 38(1), 140-149.
16. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES—2017 -Diabetes Care VOLUME 40 | SUPPLEMENT 1
17. Anticuerpos antiislotos pancreáticos (ICA) y antiinsulina (AAI) en el síndrome hipoglicémico funcional reactivo E. Cabrera-Rode1, G. Molina1, Oscar díazhorta1, O. Faget1, A. Hernández1, M. Vera1, R. González1, C. Arranz1, D. Navarro1, E. Gort2, H. Caseres3, I. Márquez4, M. Romero5, P. González6, D. Machado7, A. Seuc1 -AV DIABETOL 1996; 12: 38-47
18. Maximino Ruiz. Diabetes Mellitus. LIBRERIA AKADIA EDITORIAL. ISBN: 9789875701533

ANEXO: Modelo de Informes

LABORATORIO

NOMBRE:

FECHA

ORDEN N°:

DNI:

FECHA DE NACIMIENTO:

MEDICO SOLICITANTE:

Prueba de Tolerancia Oral a la glucosa (PTOG)

Carga de glucosa 75 gr

Método:

	Valor Hallado	Valor de referencia
Glucemia basal		
Glucemia a las 2 hs		

Firma y sello del Bioquímico

GLOSARIO

ADA: Asociación Americana de Diabetes

ALAD: Asociación Latinoamericana de Diabetes

SAD: Sociedad Argentina de Diabetes

IDF: Federación Internacional de Diabetes

EASD: Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes

GTDE: Grupo de Trabajo de Diabetes y Embarazo

EDTA: Acido Etilendiaminotetraacético

HbA1c: Hemoglobina Glucosilada o Glicosilada

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

HTA: Hipertensión Arterial

IECA: Inhibidores de ECA

IDF: Federación Internacional de Diabetes

IFCC: Federación Internacional de Bioquímica Clínica y Laboratorio en Medicina

NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program/Programa Nacional de Estandarización de la Glicoheemoglobina

NKDEP: Programa Nacional de Educación en Enfermedad Renal

PTOG: Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa

OMS: Organización Mundial de la Salud

NICE: National Institute For Health and Clinical Excellence