

CLIN12LAB

Libro de Sesiones de los Laboratorios Clínicos 2021



Editores

David Melero López

Fernando Calvo Boyero

Olga Nerea Coya Linares

Ana Elena López Jiménez

Editores de este volumen:

David Melero López, Fernando Calvo Boyero, Olga Nerea Coya Linares, Elena Ana López Jiménez

Publicado en España por:

Servicio de Análisis Clínicos y Bioquímica Clínica

Hospital Universitario 12 de Octubre

Av. de Córdoba, s/n, 28041 Madrid (España)

Tlf: 913 90 80 00

<https://www.comunidad.madrid/hospital/12octubre/profesionales/servicios-centrales/analisis-clinicos>

<https://www.comunidad.madrid/hospital/12octubre/profesionales/servicios-centrales/bioquimica-clinica>

Imagen de Portada diseñada por Víctor Felipe Sanz Fernández

I.S.B.N.: 978-84-09-30652-7

Madrid (España), 2021



Esta obra está bajo una [licencia de Creative Commons Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

CLIN12LAB

Libro de sesiones de los Laboratorios Clínicos 2021

Editores

David Melero López

Fernando Calvo Boyero

Olga Nerea Coya Linares

Elena Ana López Jiménez

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre
Madrid (España)

LISTADO DE EDITORES

David Melero López
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid
Email: david.melero@salud.madrid.org

Fernando Calvo Boyero
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid
Email: fernando.calvo@salud.madrid.org

Olga Nerea Coya Linares
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid
Email: olganerea.coya@salud.madrid.org

Elena Ana López Jiménez
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid
Email: elenaana.lopez@salud.madrid.org

LISTADO DE COLABORADORES

José Manuel Estrada Lorenzo
Bibliotecario
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Víctor Felipe Sanz Fernández
Diseñador Gráfico

Concepción Núñez Pardo de Vera
Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC)
Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid

LISTADO DE AUTORES *(por orden alfabético)*

Enrique Albuerne Suárez
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Fernando Calvo Boyero
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Mercedes Aramendi Ramos
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Laura Carrasco Parrón
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Ana Arteché López
Servicio de Genética Clínica
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Rodrigo Coloma Gutiérrez
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Alberto Blázquez Encinar
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Nerea Coya Linares
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Cecilia Cueto-Felgueroso Ojeda
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

David Cuevas Gómez
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Silvia Díaz Díaz
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Laura Díez Alonso
Servicio de Inmunología
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Carmen Domínguez Alonso
Servicio de Inmunología
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Alba Fernández del Pozo
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Irene Gómez Manjón
Servicio de Genética
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

María José Gómez Rodríguez
Servicio de Genética
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Sandra Gómez Rojas
Servicio de Hematología y Hemoterapia
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Irene González Martínez
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Adrián González Quintana
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Javier Hernando Redondo
Servicio de Análisis Clínicos
Hospital Universitario Dr. Josep Trueta, Gerona

Beatriz Hidalgo Calero
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Irene Hidalgo Mayoral
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

María Victoria Huertas García
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Elena Ana López Jiménez
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

José Miguel Lezana Rosales
Servicio de Genética
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Ilenia Liria González
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Evangelina López de Maturana
Grupo de Epidemiología Genética y Molecular
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Nuria Malats
Grupo de Epidemiología Genética y Molecular
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Miguel Ángel Martín Casanueva
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Carmen Palma Milla
Servicio de Genética
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Maialen Palomino Alonso
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Daniel Párraga García
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Ylenia Pérez Arnaiz
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Rubén Pérez de la Fuente
Servicio de Genética
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Daniel Párraga
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Laura Parés Pollán
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Juan Francisco Quesada Espinosa
Servicio de Genética
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Laura Rausell Sánchez
Instituto de Medicina Genómica (IMEGEN)

Carmen Alhena Reyes Ruiz
Servicio de Microbiología
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Cristian Rosas Espinoza
Servicio de Farmacia Hospitalaria
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Daniel Rueda Fernández
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Jon Sánchez Munárriz
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

María Teresa Sánchez Calvín
Servicio de Genética Clínica
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Maite Serrando Querol
Servicio de Análisis Clínicos
Hospital Universitario Dr. Josep Trueta, Gerona

Pablo Serrano Lorenzo
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Diego Tuñón Le Poutel
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

PRÓLOGO

Este libro surge de con la intención de que todo el que quiera pueda acceder, a lo largo de los capítulos, a los contenidos formativos impartidos en las sesiones internas de los Servicios Centrales del Hospital Universitario 12 de Octubre. Así mismo, se incluyen capítulos que, aunque no están incluidos dentro del programa formativo, se consideran de interés porque versan sobre temas novedosos dentro del ámbito del Laboratorio Clínico.

Agradecer a todas las personas que han participado y hecho posible esta segunda edición por el interés mostrado y su nivel de implicación en este proyecto que comenzó a gestarse hace un año con una gran ilusión y que, en la segunda edición, incluye capítulos realizados por autores de diferentes hospitales y servicios del laboratorio.

Consideramos importante la divulgación de este libro para poner de manifiesto la importancia del papel del Laboratorio como parte del engranaje que hace posible el correcto funcionamiento del sistema sanitario.

Por último, agradecer a todos los profesionales que son ejemplo de dedicación y esfuerzo, sirviendo como inspiración a muchos otros para no dejar de mejorar e innovar con el objetivo de dar la mejor atención.

Dr. Joaquín Arenas Barbero
Director Científico del Instituto de Investigación i+12

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BLOQUE I SESIONES DE BIOQUÍMICA CLÍNICA	15
EVALUACIÓN DEL EQUILIBRIO HIDROELECTROLÍTICO. Autores: David Cuevas Gómez, Cecilia Cueto-Felgueroso Ojeda	16
EL METABOLISMO LIPÍDICO Y SUS PATOLOGÍAS. Autores: David Cuevas Gómez, Cecilia Cueto Felgueroso-Ojeda.....	23
URIANÁLISIS. Autores: Ylenia Pérez Arnaiz, Alba María Fernández Del Pozo	31
BIOQUÍMICA DEL ENDOTELIO VASCULAR. Autores: Elena Ana López Jiménez, Silvia Díaz Díaz	37
CORTEZA SUPRARRENAL. Autores: Maialen Palomino Alonso, Mercedes Aramendi Ramos..	45
MINERALOCORTICOIDES: ALDOSTERONA. Autores: Ylenia Pérez Arnaiz, Ilenia Liria González	53
ALTERACIONES DEL CRECIMIENTO. Autores: Irene González Martínez, Silvia Díaz Díaz	58
EMBRIOLOGÍA HUMANA Y BIOLOGÍA DEL DESARROLLO. Autores: Jon Sánchez Munárriz, Silvia Díaz Díaz.....	63
SEGUIMIENTO DE LA GESTACIÓN EN EL LABORATORIO. Autores: Jon Sánchez Munárriz, Ilenia Liria González.....	70
MONITORIZACIÓN DE FÁRMACOS EN EL LABORATORIO DE URGENCIAS. Autores: Fernando Calvo Boyero, Cristian Rosas Espinoza, Cecilia Cueto-Felgueroso Ojeda.....	77
INTERACCIONES GRAVES ENTRE ANTIRRETROVIRALES Y OTROS FÁRMACOS A PROPÓSITO DE UN CASO. Autores: Laura Carrasco Parrón, Alba Fernández del Pozo	84
HOJA DE RUTA PARA ACREDITARSE MEDIANTE ALCANCE FLEXIBLE EN UN LABORATORIO CLINICO ANTERIORMENTE ACREDITADO POR LA NORMA ISO 15189 CON ALCANCE FIJO. Autores: Daniel Párraga García, Laura Parés Pollán	89
HERRAMIENTAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y PRIORIZACIÓN DE OPORTUNIDADES DE MEJORA EN UN LABORATORIO CLÍNICO. Autores: Daniel Párraga García, Laura Parés Pollán	94
APLICACIÓN DE UN CICLO DE MEJORA PARA LA GESTIÓN AUTOMATIZADA DE MUESTRAS DE HEMÓLISIS EN UN LABORATORIO CLÍNICO. Autores: Daniel Párraga García, Laura Parés Pollán	99
BLOQUE II SESIONES DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA	106
ANÁLISIS DE VARIANTES RARAS EN CÁNCER DE VEJIGA. UN ESTUDIO BASADO EN EXOMA. Autores: Alba Fernández del Pozo, Evangelina López de Maturana, Nuria Malats	107
REVISIÓN DE LAS GUÍAS CLÍNICAS DE DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE SÍNDROMES DE POLIPOSIS ADENOMATOSAS. Autores: Enrique Albuérne Suárez, Diego Tuñón Le Poutel, Daniel Rueda Fernández	116
SECUENCIACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL COMPLETO. A PROPÓSITO DE DOS CASOS. Autores: Adrián González-Quintana, Alberto Blázquez Encinar, Miguel Ángel Martín Casanueva	121
ESTRATEGIAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES MITOCONDRIALES. Autores: María Victoria Huertas García, Pablo Serrano-Lorenzo, Miguel Ángel Martín Casanueva	127
APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA DE LA ENFERMEDAD DE WILSON: A PROPÓSITO DE UN CASO. Autores: Irene Hidalgo Mayoral, Irene Gómez Manjón, Ana Arteché López.....	133

HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA POR DÉFICIT DE 21-HIDROXILASA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y ASESORAMIENTO GENÉTICO. Autores: Rubén Pérez de la Fuente, María Teresa Sánchez Calvin, Carmen Palma Milla.....	139
ENTENDIENDO LAS LIMITACIONES DE LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR. PCR DIGITAL: A PROPÓSITO DE UN CASO. Autores: Ana Arteche-López, Laura Rausell Sánchez, María Teresa Sanchez Calvin.....	149
BIOPSIA LÍQUIDA. Autores: Ylenia Pérez Arnaiz, Beatriz Hidalgo Calero.....	156
LA BIOINFORMÁTICA EN LA INTERPRETACIÓN DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA. Autores: José Miguel Lezana Rosales, Juan Francisco Quesada Espinosa, María José Gómez Rodríguez	161
BLOQUE III SESIONES DE OTRAS ESPECIALIDADES DEL LABORATORIO	171
NUEVAS TECNOLOGÍAS EN EL LABORATORIO CORE DE HEMATOLOGÍA. Autores: Fernando Calvo Boyero, Javier Hernando Redondo, Maite Serrando Querol	172
HEMOSTASIA EN EL LABORATORIO DE URGENCIAS: INTERPRETACIÓN DE LOS PARÁMETROS BÁSICOS. Autores: Fernando Calvo Boyero, Sandra Gómez Rojas	180
ARTRITIS SÉPTICA. Autores: Olga Nerea Coya Linares, Carmen Alhena Reyes Ruiz	186
LA ENFERMEDAD CELIACA. Autor: David Cuevas Gómez.....	192
INMUNOTERAPIA EN MIELOMA MÚLTIPLE REFRACTARIO. Autores: Laura Díez Alonso, Rodrigo Coloma Gutiérrez, Carmen Domínguez Alonso.....	197
GLOSARIO	203

BLOQUE I

SESIONES DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

EVALUACIÓN DEL EQUILIBRIO HIDROELECTROLÍTICO

Autores: David Cuevas Gómez, Cecilia Cueto-Felgueroso Ojeda

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Iones, Electrolitos

INTRODUCCIÓN: DISTRIBUCIÓN DE LÍQUIDOS CORPORALES

En el ser humano, a la solución líquida que baña las células se la conoce con el nombre de medio interno.

La regulación de la composición de dicho medio interno es muy estricta: pequeñas variaciones de la misma desencadenan respuestas inmediatas que tienden a restablecer las condiciones basales.

- Distribución corporal de los líquidos:

El agua representa el 40-70% del peso corporal de un adulto y está dividida entre dos compartimentos:

- Compartimento intracelular: Supone 2/3 del agua total del organismo.
- Compartimento extracelular: Representa 1/3 del agua total. Se divide entre tres localizaciones fundamentalmente:
 - Líquido intravascular: Es el plasma y supone 1/4 del líquido extracelular.
 - Líquido intersticial: Es el líquido extravascular y representa 3/4 partes del total del líquido extracelular.
 - Líquido transcelular: Forma parte del líquido extracelular pero de forma minoritaria. Supone del 1-3% del peso corporal. Dentro de éste se encuentran: el líquido cefalorraquídeo, el líquido intraocular y los líquidos serosos (pleural, sinovial, peritoneal y pericárdico).
- Composición de los líquidos corporales:
 - Líquido extracelular: El plasma y el líquido intersticial presentan una composición muy similar:
 - Cationes mayoritarios: Sodio (Na^+).
 - Aniones mayoritarios: Cloro (Cl^-) y bicarbonato (HCO_3^-).

La principal diferencia en la composición entre plasma y el líquido intersticial es el alto contenido de proteínas del plasma. Estas proteínas no pueden atravesar el endotelio capilar y, por tanto, no suelen encontrarse en el líquido intersticial.

- Líquido intracelular:
 - Cationes mayoritarios: Potasio (K^+) y en menor concentración, magnesio (Mg^{2+})
 - Aniones mayoritarios: fosfatos (PO_4^{3-}), sulfatos (SO_4^{2-}) y ciertos aminoácidos de las proteínas.

El líquido intracelular y extracelular están separados por la membrana celular cuya permeabilidad selectiva permite la distinta composición de los dos compartimentos.

La membrana celular es la barrera que separa el espacio intracelular y extracelular. Es permeable al agua y a algunos solutos (urea). Mantiene la diferente composición electrolítica de los líquidos que separa gracias a la presencia de la bomba ATPasa de Na^+/K^+ que transporta K^+ al interior celular y Na^+ al exterior.

El agua del organismo procede, sobre todo, de la ingesta y, en menor medida del metabolismo oxidativo.

La eliminación del agua del organismo se produce fundamentalmente, por vía urinaria y se regula hormonalmente. Otras formas de eliminación son las heces, la evaporación en la piel o la respiración. Estas tres formas de eliminación constituyen las pérdidas insensibles de agua.

PRESIÓN OSMÓTICA, OSMOLALIDAD Y PRESIÓN ONCÓTICA

El agua atraviesa las membranas celulares con relativa facilidad en una u otra dirección en función del contenido de sustancias osmóticamente activas a uno y otro lado de la membrana. El agua pasará del compartimento más diluido al más concentrado.

La presión osmótica es la presión necesaria para detener el paso de agua a través de una membrana semipermeable que separa dos soluciones de distinta concentración de compuestos osmóticamente activos.

Si las células tienen mayor concentración en compuestos osmóticamente activos que el plasma, su presión osmótica es mayor y por tanto, captan agua del plasma hasta alcanzar el equilibrio. Por otro lado, si las células tienen menor concentración en compuestos osmóticamente activos que el plasma, su presión osmótica es menor y, por tanto, pierden agua y se deshidratan.

La osmolalidad plasmática: se define como la concentración molar de todas las partículas osmóticamente activas por kilogramo de solvente y su valor en plasma se encuentra entre 280-295 mmol/Kg o mOsm/Kg y debe mantenerse entre estos límites tan estrechos para evitar el tránsito de agua entre los espacios intra y extracelular.

La osmolalidad del plasma es igual a la del líquido intersticial y a la del líquido intracelular. Los tres líquidos son isotónicos. Únicamente la orina puede tener grandes variaciones en su osmolalidad que va desde 50-900 mmol/kg o mOsm/Kg.

La osmolaridad es la concentración de todas las partículas osmóticamente activas por litro de disolución. La osmolalidad y la osmolaridad son más o menos equivalentes para soluciones muy diluidas (donde 1 Kg de solvente corresponde a 1 L de disolución). Si la concentración de lípidos y proteínas en plasma es normal, no hay una gran diferencia entre osmolalidad y osmolaridad pero si hay una

elevada concentración de lípidos y proteínas la osmolaridad estará falsamente reducida.

Los osmómetros miden el descenso del punto de congelación o el aumento del punto de ebullición de la disolución respecto al agua. Aportan datos de osmolalidad. Para calcular la osmolaridad del plasma, en situaciones normales, se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Osmolaridad plasmática} = \text{Osmolalidad medida} \times 0,93$$

- Cálculo de la osmolalidad plasmática:

Los principales solutos presentes en el plasma que contribuyen en la presión osmótica son: el sodio, la glucosa y la urea. Conociendo sus concentraciones podemos estimar la osmolalidad empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Osmolalidad plasmática [(mmol/mOsm)/Kg de agua]} = 2 \times [\text{Na}^+](\text{mEq/L}) + [\text{glucosa}]/18(\text{mg/dL}) + [\text{urea}]/6(\text{mg/dL})$$

La concentración del sodio se multiplica por dos debido a que por cada catión sodio debe existir un anión. La concentración de glucosa y la de urea se dividen por un factor que permite transformar la concentración en mg/dL a mmol/L.

El sodio sérico constituye más del 90% de la osmolalidad en el espacio extracelular y se mantiene en condiciones normales entre 136-145 mEq/l. La glucosa, en condiciones normales, solo aporta 5 mOsm/kg y la urea es un **osmol** ineficaz porque atraviesa las membranas celulares, por tanto, la ecuación anterior se puede simplificar:

$$\text{Osmolalidad eficaz del plasma} = 2 \times [\text{Na}^+](\text{mEq/L})$$

Un descenso de la osmolalidad plasmática es sinónimo de hiponatremia, sin embargo, se puede dar un incremento de la osmolalidad sin hipernatremia por ejemplo ante una hiperglucemia marcada.

- Presión osmótica y presión oncótica:

Las proteínas no pueden atravesar el endotelio capilar debido a su gran tamaño. En plasma hay una elevada concentración de proteínas sin embargo, en el líquido intersticial es baja.

Las proteínas del compartimento intravascular ejercen una presión oncótica o coloidosmótica. La distribución de agua entre el compartimento intravascular y el intersticial está determinada, fundamentalmente, por la presión oncótica generada por las proteínas que tiende a retener agua en el interior de los vasos y que es contrastada por la presión hidrostática que favorece la salida de agua al líquido intersticial.

La albúmina es la proteína más abundante del plasma y es la principal responsable de la presión oncótica.

Ante una hipoproteinemia, la presión hidrostática puede ser mayor que la oncótica de tal manera que se producirá una extravasación de líquido originando la aparición de edemas.

REGULACIÓN DEL EQUILIBRIO HIDROELECTROLÍTICO

- Regulación de la osmolalidad:

La osmolalidad se regula mediante la ingesta y la excreción de agua libre.

En el hipotálamo existen unas células especializadas con osmorreceptores que detectan diferencias entre la osmolalidad intra y extracelular. Cuando la osmolalidad plasmática es superior a 285 mmol/Kg o mOsm/Kg estimulan la liberación de vasopresina o ADH. Por otro lado, ante una osmolalidad superior a 295 mmol/Kg o mOsm/Kg estimulan la sensación de sed.

La hormona antidiurética o ADH o vasopresina está constituida por nueve aminoácidos. Esta hormona se sintetiza en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo y es liberada a nivel de la neurohipófisis.

La vasopresina se une a su receptor de membrana en las células del túbulo distal y del túbulo colector de la nefrona y estimula la síntesis y el transporte de la proteína acuoporina 2 hasta la membrana luminal favoreciendo así la reabsorción de agua. De este modo, se reduce la hiperosmolalidad plasmática al mismo tiempo que el volumen de orina disminuye y se eleva su osmolalidad.

- Balance de sodio:

La entrada de sodio en el organismo se produce, fundamentalmente, con la dieta y es muy variable. En circunstancias normales, la mayoría de este sodio se elimina por vía renal, y en menor proporción, por el sudor y el aparato gastrointestinal.

El sodio que se filtra por el glomérulo se reabsorbe posteriormente en el túbulo contorneado proximal. Junto con este sodio también se reabsorbe cloro y agua. El resto del sodio se reabsorbe en el asa de Henle y en el túbulo contorneado distal y el túbulo colector.

La excreción renal de sodio se regula a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona y en menor medida, por los péptidos natriuréticos atrial y ventricular.

La concentración urinaria de sodio tiene un intervalo de referencia mucho más amplio que el plasma ya que la excreción depende de la ingesta. La cuantificación del sodio urinario debe realizarse sobre muestras de orina de 24 horas.

- Sistema renina-angiotensina-aldosterona:

En la nefrona hay un grupo de células especializadas situadas en la arteriola aferente, en la eferente y en la mácula densa del túbulo distal que forman el aparato yuxtaglomerular.

Estas células son sensibles a un descenso de presión arterial en la arteriola aferente o del sodio plasmático en el túbulo distal. Un descenso de presión en la arteriola aferente puede deberse a un bajo volumen plasmático. Por otro lado, el descenso de la cantidad de sodio en el túbulo distal puede estar causado también por un bajo volumen plasmático (en

estas situaciones se filtra por el glomérulo menor cantidad de plasma y por tanto también hay menor concentración de sodio en el túbulo distal) o por un déficit plasmático de sodio.

Ante cualquiera de estas dos situaciones, las células del aparato yuxtaglomerular secretan la enzima proteolítica renina que actúa sobre el angiotensinógeno, una proteína sintetizada en el hígado y liberada a la circulación. Tras la actuación de la renina sobre el angiotensinógeno se libera un decapeptido denominado angiotensina I.

Este decapeptido pierde posteriormente dos aminoácidos por acción de la ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina) para generar angiotensina II. La ECA abunda a nivel de los capilares pulmonares.

La angiotensina II es un potente vasoconstrictor que aumenta la presión arterial y además estimula la producción de aldosterona en la corteza suprarrenal.

La aldosterona estimula la reabsorción de sodio en el túbulo distal intercambiándolo por potasio y protones. Por otro lado, esta hormona también reduce la eliminación de sodio por el sudor. El resultado global es un descenso de la eliminación de sodio y un incremento de la eliminación de potasio. Además, el incremento de la reabsorción de sodio lleva asociado una mayor reabsorción de agua en el túbulo distal.

- Péptidos natriuréticos:

El péptido natriurético atrial y el péptido natriurético ventricular son dos hormonas secretadas respectivamente por la aurícula y el ventrículo del corazón ante una dilatación de estas cavidades, lo que es sinónimo de un elevado volumen intraplasmático. Este péptido estimula la eliminación renal de sodio y frena la secreción de aldosterona por lo que se incrementa la concentración de sodio en orina y se favorece la eliminación de agua.

• Balance de potasio:

El potasio es el principal catión intracelular. En el interior de las células alcanza concentraciones 25 veces más altas que en el plasma. Este gradiente de potasio se mantiene gracias a la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATP-asa de las membranas celulares que expulsa sodio hacia el exterior celular al mismo tiempo que introduce potasio en el interior celular consumiendo para ello ATP.

El potasio juega un papel muy importante en la contracción muscular y en la transmisión del impulso nervioso, ya que es el gradiente de potasio el principal contribuyente del potencial de membrana en reposo.

La ingesta de potasio es muy variable en función de la dieta. La vía de eliminación más importante es el riñón: el potasio se filtra en el glomérulo y se reabsorbe casi completamente en el túbulo proximal donde se intercambia por protones. En el túbulo contorneado distal se secreta potasio o protones al mismo tiempo que se reabsorbe sodio. Este último intercambio está regulado por la hormona aldosterona y por el equilibrio ácido-base. Otra vía de eliminación de potasio son las heces a través de las cuales se elimina el 10% del total del potasio excretado.

El potasio es un ion fundamentalmente intracelular por lo que su concentración apenas varía en respuesta al volumen de agua extracelular. Sin embargo, los niveles de potasio

plasmático pueden variar significativamente ante movimientos de potasio entre el medio extracelular e intracelular. Por ejemplo, ante un estado de acidosis, se incrementa la concentración de protones en el plasma. En esta situación las células captarán protones del exterior celular y los intercambian por potasio en un intento de neutralizar esta acidosis. Además, en el túbulo contorneado distal la reabsorción de sodio se lleva a cabo intercambiándolo por protones de modo que se elimina menos potasio en orina. Todo ello conduce a un incremento de potasio en sangre.

• Balance de cloruro:

El cloruro es el principal anión extracelular y juega un papel importante en el mantenimiento de la osmolalidad y electroneutralidad del medio extracelular.

La principal fuente de cloruro es la dieta. El cloruro se suele encontrar en los alimentos acompañado de sodio y se absorbe prácticamente en su totalidad. Se filtra libremente por el glomérulo y se reabsorbe en el túbulo contorneado proximal en cotransporte con el sodio. En el asa de Henle también existe una reabsorción activa de sodio. Al igual que ocurría con el sodio, el cloro también se elimina por el sudor.

Generalmente, los niveles de cloruro son paralelos a los de sodio y tienen poca significación clínica. Solo se desvían de las concentraciones de sodio en las alteraciones del equilibrio ácido-base.

ALTERACIONES DE LOS ELECTROLITOS

• Alteraciones en la concentración plasmática de sodio:

- Hipernatremia:

Es el incremento del sodio plasmático por encima de 145 mEq/L por lo que siempre habrá hiperosmolaridad plasmática. Esto provoca la salida de agua desde el interior celular hacia el líquido extracelular, lo que origina deshidratación intracelular. La disminución del volumen neuronal causa síntomas neurológicos como: letargia, temblor muscular, convulsiones y coma. Hay varios tipos de hipernatremia:

1. Hipernatremia hipervolémica: Se produce una retención de sodio acompañada de una retención de agua en menor proporción. La hipernatremia hipervolémica puede tener varias etiologías:

- Hiperaldosteronismo: La producción excesiva de aldosterona origina una retención excesiva de sodio en los túbulos renales que se acompaña en menor medida, de una retención de agua. La orina presentará una osmolalidad elevada (>800 mmol/kg) y un volumen reducido. El potasio en suero estará bajo mientras que en orina estará elevado.

- Síndrome de Cushing: El exceso de glucocorticoides puede estimular los receptores de aldosterona (por semejanza estructural) y produce un cuadro similar al del hiperaldosteronismo.

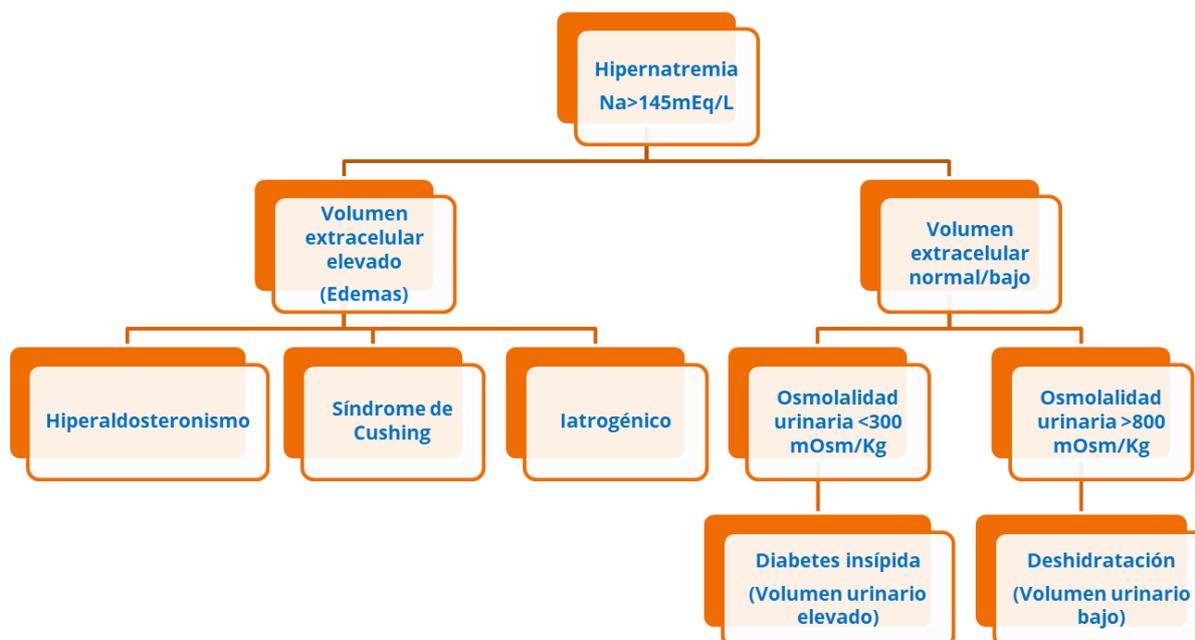


Figura 1. Esquema de las causas de hipernatremia. Elaboración propia

- Iatrogénica: Suministro excesivo de terapia salina hipertónica o de bicarbonato sódico.
2. Hipernatremia hipovolémica: Se produce una pérdida de agua que no va acompañada de una pérdida de sodio. En función de la osmolalidad y el volumen de la orina se diferencian dos etiologías:
- Osmolalidad urinaria baja (<300 mOsm/Kg) con gran volumen urinario (>3L): Diabetes insípida. Se trata de una patología en la que existe un déficit de vasopresina (diabetes insípida neurogénica) o bien el riñón es insensible a la acción de esta hormona (diabetes insípida nefrogénica). En cualquier caso, los túbulos renales (contorneado distal y colector) pierden la capacidad de absorber agua que se elimina en grandes cantidades por la orina. La concentración de sodio en la orina es baja.
 - Osmolalidad urinaria elevada (>800 mOsm/Kg) con un volumen urinario reducido. Deshidratación. Puede producirse por una baja ingesta de agua, o por un exceso de sudoración (la concentración de sodio en el sudor es menor que el líquido extracelular). La orina presentará un volumen reducido (la estimulación de los osmorreceptores hipotalámica promueve la liberación de vasopresina lo que incrementa la reabsorción de agua a nivel renal) y una osmolalidad elevada. El sodio en orina será bajo por la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona.
 - Hiponatremia:

Es el descenso del sodio plasmático por debajo de 136 mEq/L y supone la alteración electrolítica más frecuente. Si no se produce un incremento de otros compuestos

osmóticamente activos, el descenso de sodio plasmático puede producir un desplazamiento de agua al interior de las neuronas y afectar al sistema nervioso central originando: cefalea, letargia, convulsiones y coma. Ante una hiponatremia se debe medir la osmolalidad plasmática:

1. Osmolalidad normal o hiponatremia isotónica: Indica la presencia de sustancias no osmóticas en exceso (lípidos y proteínas) que reducen el porcentaje de agua de un volumen determinado y con ello la concentración de sodio por unidad de volumen plasmático pero no por unidad de agua plasmática.
2. Osmolalidad aumentada o hiponatremia hipertónica: Presencia de solutos osmóticamente activos, generalmente glucosa. Ante un exceso de glucosa plasmática, la natremia baja para no contribuir aún más al incremento de osmolalidad plasmática.
3. Osmolalidad reducida o verdadera hiponatremia: Hay varias etiologías para esta situación clínica:
 - Hiponatremia hipovolémica: Se produce una pérdida de sodio y en menor proporción de agua. Puede deberse a pérdidas renales o extrarrenales, para evaluarlo se suele estudiar la concentración de sodio en orina:
 - Sodio en orina <20 mEq/L: Pérdidas extrarrenales producidas por vómitos y diarreas en las que se elimina más sodio que agua.
 - Sodio en orina >20 mEq/L: Pérdidas renales debidas a un hipoaldosteronismo (déficit de aldosterona que dificulta la reabsorción de sodio), al uso de ciertos diuréticos que impiden la reabsorción de sodio o a una situación de acidosis en la que el sodio se elimina junto con los ácidos orgánicos a través de la orina para garantizar la electroneutralidad de esta.

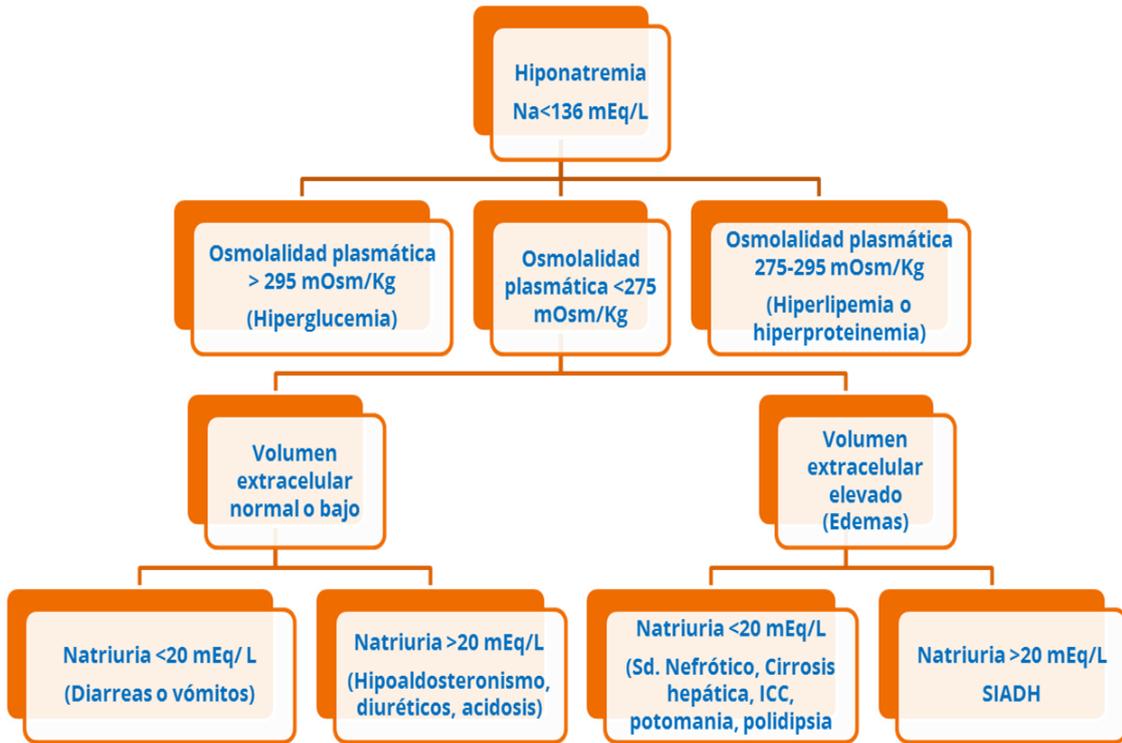


Figura 2. Esquema de las causas de hiponatremia. Elaboración propia

- Hiponatremia hipervolémica: Se produce una retención de agua que no va acompañada de retención de sodio. Una vez más se evalúa la concentración de sodio en orina:
 - Sodio en orina >20 mEq/L: Orienta hacia el síndrome de secreción inadecuada de ADH (SIADH). En esta patología se produce un incremento inespecífico de la secreción de vasopresina que no guarda relación con un incremento de la osmolalidad plasmática. La vasopresina estimula la reabsorción de agua en el riñón por lo que la orina presentará unos niveles de sodio elevados. Este síndrome se produce en personas que han sufrido traumatismos o cirugías, trastornos del sistema nervioso central, algunas neoplasias (ciertos tumores pueden secretar ADH) y determinados fármacos.
 - Sodio en orina <20 mEq/L: Se produce una extravasación de líquido desde el compartimento intravascular al extracelular. Este fenómeno se da en pacientes con cirrosis hepática o síndrome nefrótico. En ambos casos los niveles de proteínas séricas bajan y como consecuencia de ello se reduce la presión oncótica, esto promueve la salida de agua desde los vasos al compartimento extracelular. La reducción del volumen sanguíneo promueve la liberación de vasopresina y aldosterona que incrementan la reabsorción de agua y sodio contribuyendo así al aumento del volumen extracelular y a la reducción del sodio en orina. En los pacientes con insuficiencia cardíaca

ocurre algo similar, en estos pacientes se produce un incremento de la presión hidrostática que también estimula la salida de agua desde el compartimento intravascular al extracelular desencadenando los mismos mecanismos compensadores que en el caso anterior. Por último, la potomanía (deseo incontrolado de beber agua) y la polidipsia primaria (continua sensación de sed) también pueden originar una hiponatremia hipervolémica con sodio en orina bajo ya que en estas situaciones se inhibe la secreción de vasopresina y ADH ante la baja osmolalidad plasmática.

- Alteraciones en la concentración plasmática de potasio:
 - Hiperpotasemia:

La hiperpotasemia es el incremento de los niveles de potasio en sangre por encima de 5,1 mEq/L. En esta situación se reduce el potencial de membrana en reposo lo que origina debilidad muscular, parálisis y alteraciones cardíacas (bradicardia). Ante una hiperpotasemia se debe descartar, en primer lugar, que la muestra esté hemolizada y que el paciente presente leucocitosis o trombocitosis marcadas ya que cualquiera de estas tres situaciones incrementa de forma significativa los niveles de potasio in vitro. Una vez descartadas, la hiperpotasemia puede estar causada por dos mecanismos:

1. Redistribución extracelular: Se debe a una salida masiva de potasio desde el medio intracelular al extracelular. Puede estar originado por varias causas:

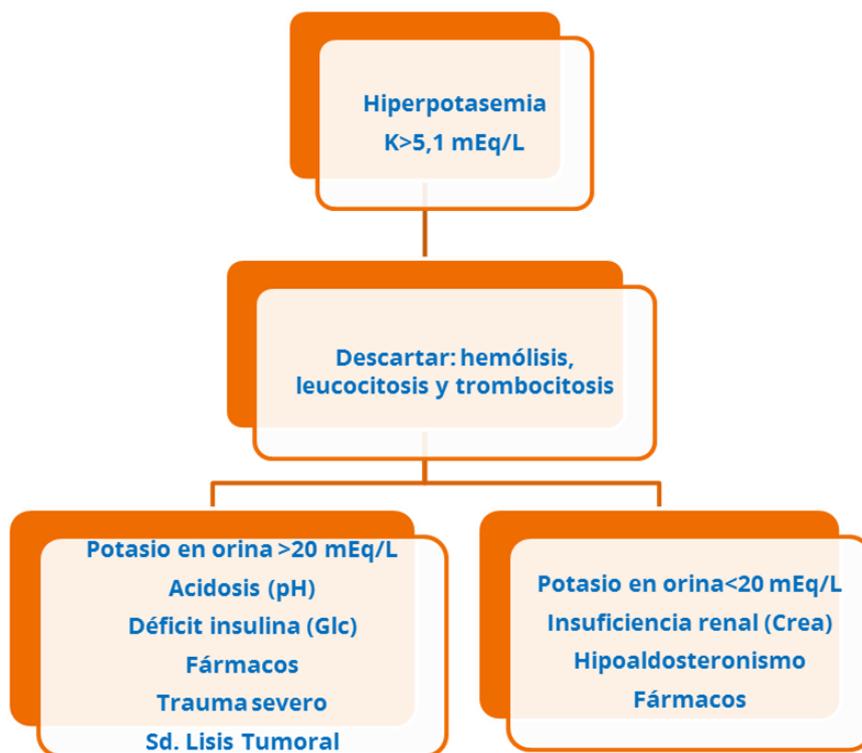


Figura 3. Esquema de las causas de hiperpotasemia. Elaboración propia

- Acidosis: En estas situaciones las células captan los protones del medio extracelular y los intercambian por potasio. Además, también se reduce la excreción urinaria de potasio lo que explica la hiperpotasemia.
 - Déficit de insulina: La insulina estimula la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATP-asa de las membranas celulares que introduce potasio al medio intracelular. Por tanto, un déficit de insulina puede producir hiperpotasemia.
 - Fármacos: Los β -bloqueantes y el digital inhiben la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATP-asa de las membranas por lo que también producen hiperpotasemia.
 - Lesión celular importante como ocurre ante un traumatismo severo o en el síndrome de lisis tumoral.
2. Descenso de la eliminación renal de potasio:
- Insuficiencia renal: En la insuficiencia renal avanzada, se produce un deterioro de la filtración glomerular y de la excreción tubular lo que origina hiperpotasemia.
 - Insuficiencia suprarrenal: Un déficit de aldosterona reduce la eliminación de potasio a través de la orina.
 - Fármacos: Aquellos que inhiben o bloquean la acción de la aldosterona también producen hiperpotasemia como los fármacos inhibidores de la ECA (captopril) o los antagonistas de la aldosterona (espironolactona) y de los receptores de angiotensina II.
- Hipopotasemia:

Una concentración de potasio plasmático inferior a 3,5 mEq/L puede producir síntomas cardiacos como taquicardias y alteraciones en el electrocardiograma. También puede originar alteraciones neuromusculares y nerviosas. La hipopotasemia puede estar causada por dos mecanismos:

1. Redistribución intracelular: Se debe a una entrada masiva de potasio desde el medio extracelular al intracelular. Cursa con niveles de potasio en orina <20 mEq/L. Puede estar desencadenado por varias causas:
 - Alcalosis: En esta situación, las células envían protones al medio extracelular al mismo tiempo que introducen potasio al medio intracelular. De este modo, se reduce la concentración de potasio en sangre. Los vómitos continuos pueden originar alcalosis debido al alto contenido en protones del jugo gástrico.
 - Exceso de insulina: La insulina estimula la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATP-asa de modo que puede provocar hipopotasemia.
 - Estímulos β -adrenérgicos: La activación de estos receptores por catecolaminas estimula la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATP-asa lo que también puede provocar hipopotasemia.
2. Elevadas pérdidas de potasio: Suelen ser pérdidas renales de potasio que cursan con niveles de potasio en orina superiores a 20 mEq/L. Estas pérdidas pueden estar causadas por un hiperaldosteronismo que promueve la reabsorción de sodio y la excreción de potasio o por el consumo de ciertos diuréticos. Por último, la hipomagnesemia severa también puede originar hipopotasemia dado que el magnesio bloquea los canales de potasio de la nefrona de modo que en

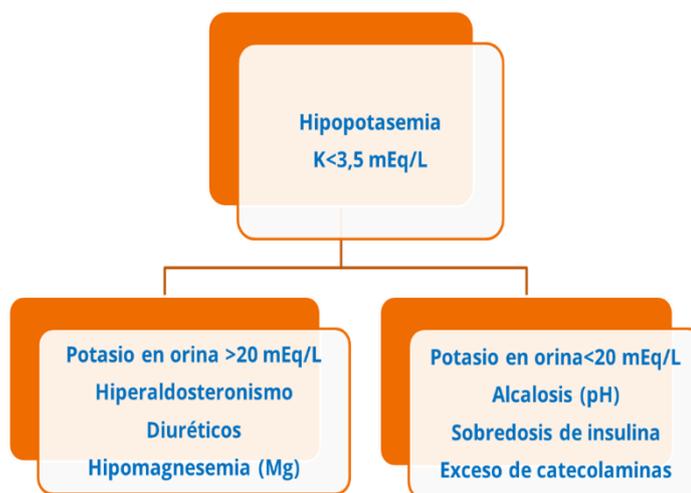


Figura 4. Esquema de las causas de hipopotasemia. Elaboración propia

ausencia de magnesio apenas se reabsorbe potasio por esta vía.

- Alteraciones en la concentración plasmática de cloruro:
- Hipercloremia:

La hipercloremia es el aumento de la concentración de cloruro en sangre por encima de 107 mEq/L. La elevación de los niveles de cloruro con concentración de sodio normal se produce en las alcalosis respiratorias crónicas o ante acidosis metabólicas que cursan con un descenso de los niveles plasmáticos de bicarbonato. En estas situaciones, los niveles de cloro aumentan para mantener la electroneutralidad del plasma. Este tipo de acidosis puede estar causadas por diarreas, por una acidosis tubular renal, por la ingesta de ciertos fármacos o incluso por la inhalación de gas cloruro.

- Hipocloremia:

La hipocloremia aparece cuando los niveles de cloro en sangre son inferiores a 98 mEq/L. El descenso de los niveles de cloruro acompañado de valores normales de natremia se producen como consecuencia de una acidosis respiratoria crónica o por una alcalosis metabólica que cursa con niveles de cloro en orina superiores a 20 mEq/L. Este grupo de patologías pueden estar causadas por:

- Hiperaldosteronismo: La aldosterona promueve la reabsorción de sodio y la excreción de potasio y protones, esto último origina una alcalosis en la que hay un exceso de bicarbonato y el cloro se elimina para mantener la electroneutralidad causando la

hipocloremia. En el síndrome de Cushing ocurre algo similar debido a la semejanza estructural entre el cortisol y la aldosterona.

- Hipopotasemia marcada: En este caso, la aldosterona promoverá la reabsorción de sodio y la excreción de protones (ya que los niveles de potasio en sangre son bajos para excretarlo), de nuevo se producirá una alcalosis con un exceso de bicarbonato y el cloro se eliminará para mantener la electroneutralidad.
- Consumo de diuréticos o de bicarbonato.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Castaño L, Calvo B, Vela A. Patología del metabolismo del agua asociado a enfermedad hipofisaria. *Rev Esp Endocrinol Pediatr.* 2010;(1):45-55.
- Coleman WB, Tsongalis JG. *The Molecular Basis of Human Diseases. Molecular Pathology.* 2ª ed. Barcelona: Elsevier; 2017.
- González A. *Principios de bioquímica clínica y patología molecular.* 2ª ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
- Guyton AC, Hall J. *Compendio de Fisiología Médica.* 12ª ed. Barcelona: Elsevier; 2011.
- Porth C, Grossman S. *Fisiopatología.* 9ª ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
- Tee K, Dang J. The suspect - SIADH. *Aust Fam Physician.* 2017 Sep;46(9):677-680.

EL METABOLISMO LIPÍDICO Y SUS PATOLOGÍAS

Autores: David Cuevas Gómez, Cecilia Cueto Felgueroso-Ojeda

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Metabolismo, Lípidos

INTRODUCCIÓN

Los lípidos constituyen un grupo de biomoléculas químicamente muy diverso que se caracterizan por ser insolubles en agua y solubles en disolventes apolares como el éter o la acetona.

Los lípidos juegan importantes funciones en los seres vivos: almacenamiento de energía, función estructural, función endocrina, entre otras.

Por otro lado, el tejido adiposo (formado por células que acumulan lípidos en su citoplasma) también desempeña múltiples funciones: sirve como protección física de ciertos órganos, como fuente de calor para los recién nacidos y además tienen un importante papel endocrino produciendo diversas hormonas como la leptina o la adiponectina.

- Clasificación de los lípidos según su estructura química:

Los lípidos se pueden clasificar según su estructura química en dos grandes grupos: lípidos saponificables y lípidos no saponificables:

- Lípidos saponificables:

Estos lípidos están constituidos por ésteres de ácidos grasos y reciben su nombre porque en presencia de ciertas bases fuertes, como el hidróxido de sodio, forman jabones. Dentro de este grupo se encuentran:

- Acilglicéridos: Son ésteres de glicerol y ácidos grasos. Como la molécula de glicerol dispone de tres grupos hidroxilo puede unir hasta tres ácidos grasos dando lugar a los monoacilglicéridos, diacilglicéridos y triacilglicéridos o triglicéridos respectivamente.
- Lípidos complejos: Son aquellos lípidos que en su estructura además de un grupo hidroxilo y carboxilo presentan un grupo químico adicional. Dentro de los lípidos complejos se encuentran:
 - Fosfoglicéridos: Están constituidos por una molécula de glicerol que posee dos ácidos grasos esterificados en las posiciones C1 y C2 y una cabeza polar unida al C3 del a través de un fosfato. En función de la molécula polar que se una se formarán distintos tipos de fosfolípidos como la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina o fosfatidilinositol.
 - Esfingolípidos: Estos lípidos surgen cuando un ácido graso se une mediante un enlace amida a una molécula de esfingosina (un aminoalcohol derivado de la serina). Al grupo hidroxilo de la esfingosina se pueden unir distintas moléculas polares; si se une la fosfocolina se formará otro fosfolípido, la

esfingomielina, mientras que si se une un glúcido se originará un glucolípido.

- Ceras: Son ésteres de ácidos grasos de cadena larga con alcoholes de cadena larga. Son totalmente insolubles en agua.

- Lípidos no saponificables:

Son aquellos lípidos que no contienen ácidos grasos en su estructura. Dentro de este grupo se encuentran:

- Isoprenoides: Son derivados de una molécula de cinco átomos de carbono: el isopreno o 2-metil-1,3-butadieno. Dentro de los isoprenoides se encuentran:
 - Terpenos: Están constituidos por varias unidades de isopreno como el geraniol, farnesol, fitol, escualeno o beta caroteno.
 - Esteroides: Son derivados complejos de los triterpenos y todos ellos comparten la estructura básica del ciclopentanoperhidrofenantreno. En este grupo se encuentran el colesterol, la vitamina D, los ácidos biliares, la progesterona, los mineralocorticoides, los glucocorticoides, la testosterona y el estradiol.
- Eicosanoides: Son derivados del ácido araquidónico y cumplen importantes funciones paracrinas. Dentro de los eicosanoides se encuentran:
 - Prostaglandinas: Las prostaglandinas de la serie 2 son las más importantes para el ser humano. Son sintetizadas por las ciclooxigenasas, y median la respuesta inflamatoria además de desempeñar otros papeles como la inhibición de la secreción gástrica.
 - Tromboxanos: Se sintetizan a partir de la prostaglandina H2 por acción de la tromboxano A2 sintasa. El tromboxano tiene importantes funciones como vasoconstrictor y estimulante de la agregación plaquetaria.
 - Leucotrienos: También derivan del ácido araquidónico pero en este caso, la enzima implicada en su síntesis es la lipoxigenasa. El leucotrieno D4 juega un papel importante en las reacciones anafilácticas al estimular la broncoconstricción.

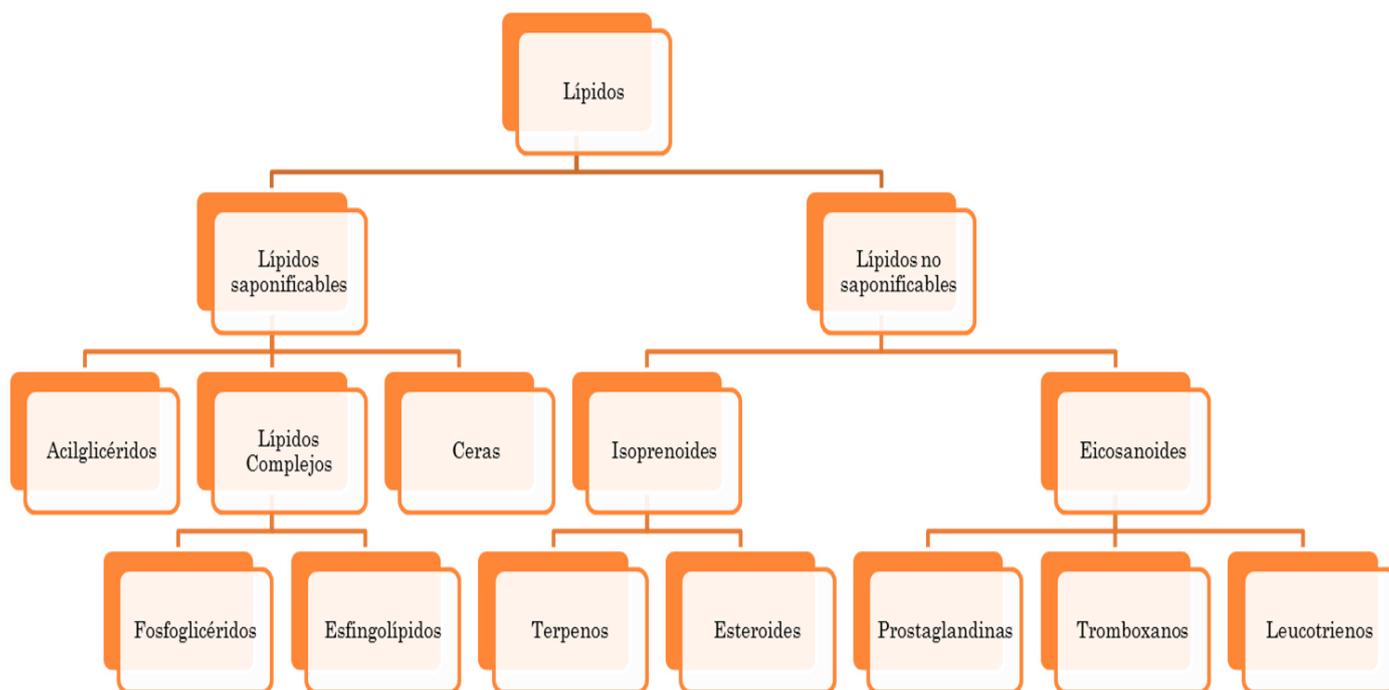


Figura 1. Esquema de la clasificación de los lípidos según su naturaleza química. Elaboración propia

EL METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS

Los lípidos presentan un carácter hidrofóbico y por tanto han de ser transportados en sangre formando parte de las lipoproteínas. Las lipoproteínas son agregados esféricos que contienen lípidos hidrofóbicos en el núcleo (triglicéridos y ésteres de colesterol) y lípidos anfipáticos (aquellos que al menos tienen un grupo polar) en la superficie como colesterol libre y fosfolípidos. En la superficie de las lipoproteínas también se localizan ciertas proteínas que reciben el nombre de apolipoproteínas.

Las lipoproteínas se clasifican según su densidad, tamaño, componente lipídico y tipo de apolipoproteína mayoritaria en su composición. Así en el torrente sanguíneo encontraremos las siguientes lipoproteínas (de menor a mayor densidad): quilomicrones, VLDL, LDL y HDL.

Estas lipoproteínas se pueden separar mediante ultracentrifugación y electroforesis. Las lipoproteínas de mayor tamaño migran menos en la electroforesis y la de menor densidad y por tanto mayor componente lipídico son las que ocupan una posición más elevada en el tubo tras la centrifugación.

- Quilomicrones y remanentes de quilomicrones:

Los quilomicrones participan en el transporte de los lípidos exógenos procedentes de la dieta a los distintos tejidos especialmente al tejido adiposo y al hígado. Estas lipoproteínas se sintetizan en el intestino y presentan un alto contenido en triglicéridos. Las principales lipoproteínas que poseen son la ApoC2, la ApoB48 y la ApoE.

ApoC2 actúa como cofactor de la lipoprotein lipasa, una enzima que se encuentra en el endotelio de los capilares y que hidroliza los triglicéridos de estas lipoproteínas a glicerol y ácidos grasos libres para que éstos últimos puedan ser captados por las células. Los quilomicrones que han perdido

los triglicéridos pero que todavía son ricos en colesterol se denominan remanentes de quilomicrones y van a ser retirados de la circulación fundamentalmente por el hígado a través del receptor LRP capaz de reconocer la ApoE presente en la superficie de estas lipoproteínas.

ApoB48 por su parte, desempeña un papel estructural confiriendo estabilidad a la lipoproteína.

- VLDL y LDL:

Las VLDL son las encargadas de transportar los triglicéridos y el colesterol que se sintetizan en el hígado al resto de los tejidos, por tanto, estas lipoproteínas son ricas en triglicéridos y colesterol de origen endógeno; como apoproteínas presentan ApoB100, ApoC2 y ApoE.

Tras la acción de la lipoprotein lipasa, las VLDL se convierten en LDL las cuales presentan un alto contenido en colesterol. A través de ApoB100, las LDL van a ser captadas por las células de distintos tejidos que utilizarán el colesterol para la síntesis de membranas biológicas o como precursor de otras moléculas de interés.

- HDL:

Las HDL se encargan de transportar el exceso de colesterol desde los tejidos hasta el hígado. Estas lipoproteínas son sintetizadas fundamentalmente por el hígado en forma de HDL naciente (HDLn), unas partículas pobres en lípidos, pero ricas en ApoA1.

ApoA1 sirve como cofactor a la enzima Lecitina Colesterol Acil Transferasa (LCAT), que se encarga de sintetizar ésteres de colesterol (los cuales pasarán a formar parte de las HDL) a partir de los fosfolípidos y el colesterol presente en la superficie de las células o de otras lipoproteínas ricas en lípidos como las VLDL o los quilomicrones.

Las HDL pueden ser retiradas por el hígado a través del receptor LRP que reconocerá la apoproteína ApoE presente en la superficie de estas partículas o bien pueden ceder sus ésteres de colesterol a los remanentes de quilomicrones y LDL a cambio de triglicéridos gracias a la acción de la Proteína Transportadora de Ésteres de Colesterol (CETP) para que sean estas últimas lipoproteínas las que sean retiradas de la circulación.

DISLIPEMIAS

Las alteraciones del metabolismo lipídico pueden ser primarias (genéticas) o secundarias a otra patología.

Una alteración de las lipoproteínas casi siempre se traduce en una alteración en la concentración de los lípidos.

Los síntomas más comunes que aparecen en las distintas dislipemias son: arco senil, xantomas (típico de hipertrigliceridemia) y xantelasma (común en hipercolesterolemia).

- Clasificación de las dislipemias primarias:

1. Hiperquilomicronemia:

Cursa con elevación de quilomicrones.

Se produce debido a un déficit de la LPL o de apoC2 de modo que se dificulta la hidrólisis de los triglicéridos.

Se trata de una enfermedad genética con herencia autosómica recesiva.

Se observan cifras de triglicéridos superiores a 1.000 mg/dL en estado postprandial.

La hipertrigliceridemia puede originar pancreatitis aguda que constituye una urgencia clínica.

- Relación entre la hipertrigliceridemia y la pancreatitis aguda:

La base fisiopatológica de la pancreatitis aguda por hipertrigliceridemia no está clara, pero se han propuesto dos posibles mecanismos:

- El primero es el daño directo por los ácidos grasos; cuando se supera la capacidad de transporte de estos por parte de la albúmina, aumenta su toxicidad. Al atravesar la circulación de los acinos pancreáticos, el medio ácido provocado por los ácidos grasos puede llevar a la activación de las enzimas pancreáticas produciendo un daño sobre el órgano.
- El segundo mecanismo parece estar mediado por los quilomicrones, que generan una obstrucción de la circulación distal del páncreas causando isquemia que puede alterar la arquitectura acinar y general la liberación de las enzimas pancreáticas.

2. Hiperlipidemia familiar combinada:

Cursa con elevación de LDL y VLDL.

Las causas bioquímicas de esta alteración aún no se conocen, aunque se ha observado una síntesis excesiva de apoB.

Estos pacientes pueden presentar hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia moderada o ambas y las alteraciones incluso pueden cambiar a lo largo del tiempo.

Constituye un elevado riesgo de enfermedad cardiaca.

3. Hipertrigliceridemia familiar:

Cursa con elevación de las VLDL sin incremento de apoB

Se detecta hipertrigliceridemia entre 250-500 mg/dL con cifras de colesterol en rango.

Suele ser asintomática y se diagnostica como hallazgo casual en un análisis bioquímico habitual.

Se ha relacionado con un mayor riesgo de obesidad y de diabetes tipo II.

4. Hipercolesterolemia familiar:

Cursa con elevación de LDL.

Se produce debido a un fallo en los receptores de LDL bien sea en su síntesis, transporte a la membrana, capacidad para interaccionar con ApoB100 o para producir una correcta endocitosis.

Se trata de una enfermedad genética con herencia autosómica dominante

Cursa con niveles muy elevados de colesterol en sangre (300-700 mg/dL).

5. Disbetalipoproteinemia:

Se produce en pacientes homocigotos que solo expresan apoE2 dado que esta variante no es capaz de interaccionar con el receptor LRP.

Se origina un incremento de los niveles séricos de QM y VLDL.

Cursa con niveles elevados de colesterol y triglicéridos.

Esta dislipemia se considera muy aterogénica.

- Dislipemias secundarias:

A diferencia de las anteriores, este tipo de patologías son secundarias a algún otro trastorno y no tienen una causa genética.

Distintas enfermedades, fármacos o malos hábitos dietéticos pueden causar una alteración del metabolismo de las lipoproteínas.

Esta alteración del metabolismo puede originar hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia o ambas.

Entre las patologías que se asocian secundariamente a dislipemias se encuentran: la diabetes mellitus, la insuficiencia renal, la gota y las hepatopatías.

Todas estas alteraciones deben descartarse antes de sospechar una dislipemia primaria.

EL METABOLISMO DEL COLESTEROL

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en los países desarrollados, representando un tercio del total de fallecimientos. Dado que estas patologías se asocian a niveles elevados de LDL-colesterol, intentar reducir estos niveles se ha convertido en uno de los objetivos

principales para de los sistemas nacionales de salud y para ello es fundamental conocer el metabolismo del colesterol.

Las dos fuentes principales del colesterol son la dieta y la síntesis endógena.

- Biosíntesis de colesterol:

La biosíntesis del colesterol tiene lugar fundamentalmente en el citosol y en el retículo endoplasmático liso de los hepatocitos.

En primer lugar, dos moléculas de acetil-CoA citosólicas se condensan para formar el acetoacetil-CoA en una reacción catalizada por una tiolasa. A continuación, este acetoacetil-CoA se condensa con otra molécula de acetil-CoA para formar el β -hidroxi-metilglutaril-CoA o HMG-CoA por acción de la HMG-CoA sintasa.

El paso de HMG-CoA a mevalonato es el paso limitante en la biosíntesis de colesterol. Esta reacción está catalizada por la HMG-CoA reductasa (una enzima integral de la membrana del retículo endoplasmático liso) y sobre ella recae la mayor parte de la regulación de la biosíntesis del colesterol. Además, esta reacción consume 2 moléculas de NADPH.

Una vez en el citosol este mevalonato se activa mediante 3 fosforilaciones consumiendo 3 moléculas de ATP. Posteriormente, tiene lugar una reacción de descarboxilación de modo que se forma el isopentenil-pirofosfato que por isomerización origina dimetilalil-pirofosfato. Estas dos moléculas se condensan para formar el geranyl-pirofosfato, el cual a su vez se condensa con otro isopentenil-pirofosfato para originar el farnesil-pirofosfato.

Por último, dos moléculas de farnesil-pirofosfato se vuelven a condensar para dar lugar al escualeno en una reacción dependiente de NADPH. A continuación, este escualeno es atacado por una oxidasa que va a introducir un grupo epóxido entre el C2 y C3 lo que facilita que la estructura del escualeno se cicle para formar el lanosterol. Este lanosterol va a sufrir más de quince reacciones químicas hasta originar el 7-dehidrocolesterol que finalmente se reduce a colesterol.

Niveles elevados de colesterol intracelular van a activar a la encima Acil-CoA-Colesterol-AcilTransferasa (ACAT) que cataliza la síntesis de ésteres de colesterol a partir de colesterol y de acil-CoA favoreciendo así su almacenamiento. Por otro lado, también van a inhibir la expresión del receptor de LDL y en el hígado también inhibirán la expresión de la enzima HMG-CoA reductasa, la principal enzima reguladora de la ruta.

El colesterol desempeña una importante función estructural al formar parte de las membranas biológicas. Además, también es un precursor de muchas moléculas de interés, entre las que se encuentran las hormonas esteroideas. Por otro lado, el 7-dehidrocolesterol también puede ser empleado para sintetizar vitamina D3 a nivel cutáneo.

Por último, en el hígado, el colesterol puede ser utilizado para sintetizar los ácidos biliares, los cuales se liberan al intestino para emulsionar los lípidos y favorecer así su digestión. La producción de ácidos biliares comienza con la hidroxilación del colesterol, la etapa limitante del proceso es la primera reacción que está catalizada por la 7-alfa-hidroxilasa. Los ácidos biliares primarios más importantes que se sintetizan

en el hígado son el ácido cólico y el quenodesoxicólico que se conjugan con glicina o taurina para originar las sales biliares las cuales se almacenan en la vesícula biliar para liberarse al duodeno durante la digestión. Un porcentaje de estas sales se reabsorbe posteriormente en el íleon mientras que el resto se elimina con las heces.

METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Los triglicéridos constituyen la principal reserva de energía del organismo dado que la oxidación de ácidos grasos produce más ATP que la oxidación de la glucosa. Los ácidos grasos pueden llegar a los tejidos como triglicéridos o como ácidos grasos libres.

Los triglicéridos van a ser transportados por los quilomicrones o por las VLDL en función de su origen. La lipoproteína lipasa va a degradar los triglicéridos de ambos tipos de lipoproteínas a glicerol y ácidos grasos libres que podrán ser captados por las células.

Por otro lado, determinadas hormonas como el glucagón y la adrenalina pueden estimular la lipólisis sobre el tejido adiposo de modo que se van a degradar los triglicéridos almacenados en este tejido a glicerol y ácidos grasos libres que serán liberados al torrente circulatorio. Estos ácidos grasos van a ser transportados por la albúmina hasta los distintos tejidos.

1. β -oxidación de los ácidos grasos:

La beta-oxidación de los ácidos grasos ocurre en la matriz mitocondrial y para ello los ácidos grasos deben penetrar al interior de la mitocondria. Los ácidos grasos de más de 12 átomos de carbono deben convertirse en acil-CoA para adentrarse en la matriz mitocondrial. Esta reacción está catalizada por la Acil-CoA sintetasa una enzima localizada en la membrana mitocondrial externa y que va a consumir dos enlaces fosfato de alta energía del ATP para llevar a cabo la reacción.

A continuación, también en la membrana mitocondrial externa, el acil-CoA se va a transformar en acil-carnitina para poder atravesar la membrana mitocondrial interna. Una vez en la matriz se volverá a regenerar el acil-CoA. Estas reacciones están catalizadas por las carnitina-acil transferasas.

Ya en la matriz mitocondrial, los acil-CoA van a sufrir la beta oxidación que consta de 4 etapas:

- Una deshidrogenación catalizada por la Acil-CoA deshidrogenasa que va a reducir un FAD a FADH y a introducir un doble enlace en el interior de la cadena hidrocarbonada.
- A continuación, tiene lugar una hidratación catalizada por la enoil-CoA hidratasa que origina la incorporación de un grupo hidroxilo en la molécula.
- Posteriormente, se produce una deshidrogenación catalizada por la L-beta-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa que va a reducir un NAD a NADH oxidando el grupo hidroxilo a carbonilo.

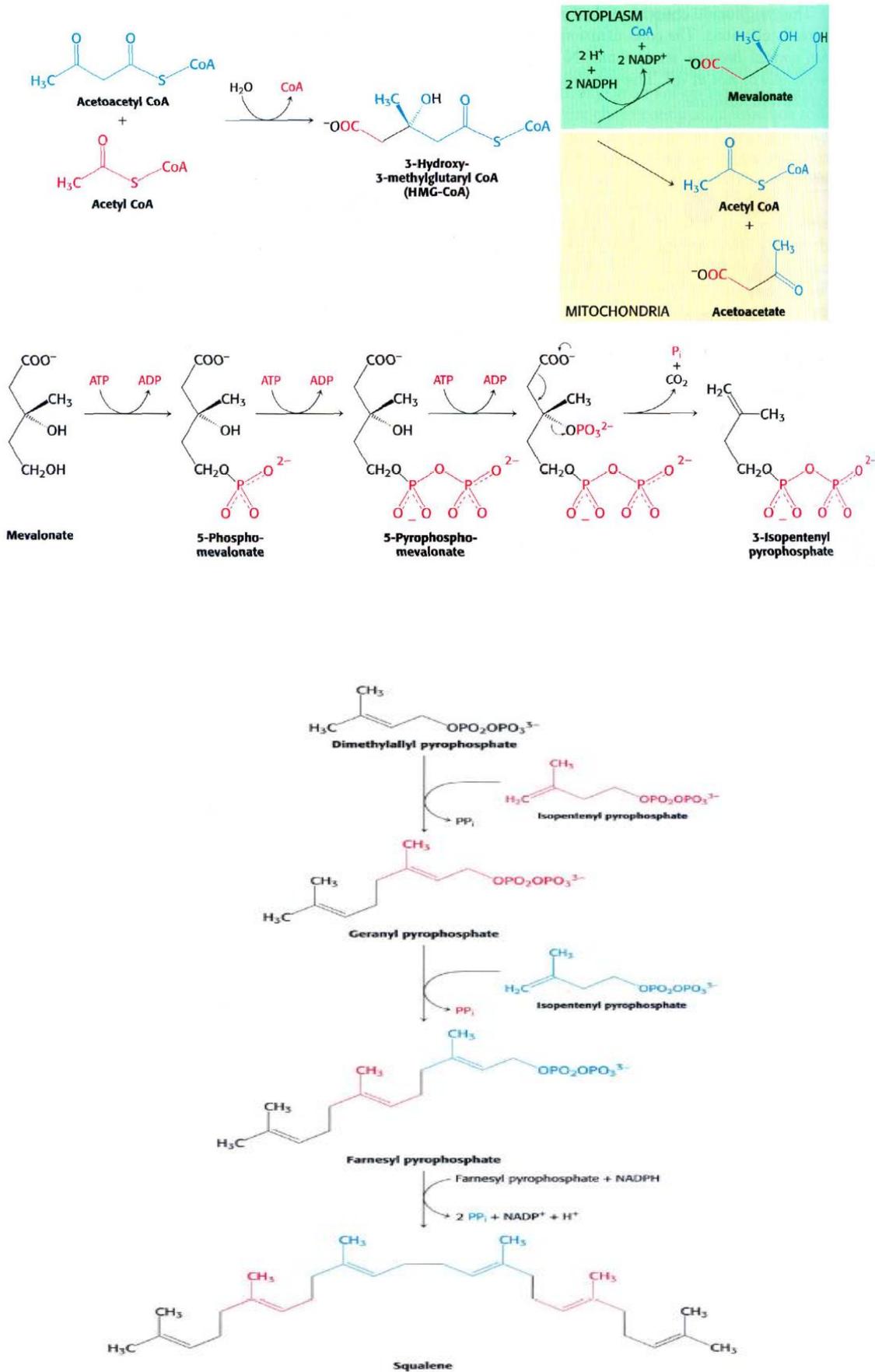


Figura 2. Esquema de la biosíntesis de colesterol. Tomado de Berg JM *et al*, 2007

- Por último, va a actuar una tiolasa que utilizando el grupo carbonilo va a liberar un acetil-CoA reduciendo en 2 átomos de carbono la cadena de acil-CoA de partida que volverá a sufrir otro ciclo de beta oxidación.

Por tanto, en cada ciclo de beta-oxidación se va a generar un NADH, un FADH y un acetil-CoA, salvo en el último ciclo en el que se van a liberar 2 acetil-CoA. Si el ácido graso tiene un número impar de átomos de carbono, en el último ciclo se liberará un acetil-CoA y un propionil-CoA que se degradará a través de otra ruta enzimática. Los dos cofactores reducidos cederán sus electrones a la cadena respiratoria para contribuir a la síntesis de ATP mientras que el acetil-CoA será oxidado en el ciclo de Krebs.

El paso limitante en la oxidación de los ácidos grasos es la transferencia de los acil-CoA al interior de la mitocondria. De este modo, la principal regulación de la ruta recae sobre la carnitina-acil transferasa I que se va a inhibir por malonil-CoA, el primer intermediario en la biosíntesis de ácidos grasos. Esta ruta se activa ante un exceso de glúcidos por lo que en estas situaciones no es necesaria la oxidación de los ácidos grasos ya que las células obtendrán energía gracias a la oxidación de la glucosa.

2. Biosíntesis de ácidos grasos:

El hígado va a sintetizar ácidos grasos ante un exceso de glúcidos y los va a exportar al resto de los tejidos en forma de VLDL.

La síntesis de ácidos grasos va a tener lugar en el citoplasma y para ello se necesita poder reductor en forma de NADPH y acetil-CoA. Tanto el NADPH como el piruvato proceden del metabolismo de la glucosa de modo que la biosíntesis de lípidos se estimulará ante un exceso de glúcidos.

El acetil-CoA se genera en el interior de la mitocondria y debe ser exportado al citosol para iniciar la síntesis de ácidos

grasos. Sin embargo, la membrana mitocondrial interna es impermeable a este metabolito. Para solventar este obstáculo, en la mitocondria el acetil-CoA se va a condensar con oxalacetato para originar citrato en una reacción catalizada por la citrato sintasa. Este citrato ya puede atravesar la membrana mitocondrial interna y salir al citosol; una vez allí regenerará el acetil-CoA y el oxalacetato por acción de la ATP-citrato liasa que para llevar a cabo esta reacción consumirá una molécula de ATP.

El oxalacetato se convertirá en malato por la malato deshidrogenasa que a su vez va a oxidar una molécula de NADH a NAD. Este malato será atacado por la enzima málica para generar NADPH y piruvato. El NADPH se empleará para la biosíntesis de ácidos grasos mientras que el piruvato se adentrará de nuevo en la mitocondria donde actuará como sustrato de la piruvato carboxilasa que consumiendo una molécula de ATP lo convertirá en oxalacetato cerrando así el ciclo.

Una vez en el citosol, el acetil-CoA va a ser atacado por la acetil-CoA carboxilasa, la enzima que cataliza la reacción limitante en la biosíntesis de ácidos grasos y que va a convertir el acetil-CoA en malonil-CoA consumiendo un enlace de alta energía del ATP y una molécula de bicarbonato.

A continuación, actúa la ácido graso sintasa, un complejo multienzimático que está constituido por una sola cadena polipéptidica que presenta 7 centros activos diferentes. Esta enzima siempre va a sintetizar ácido palmítico a partir de una molécula de acetil-CoA, 7 malonil-CoA y 14 NADPH. El proceso de síntesis tiene lugar mediante ciclos de 4 reacciones:

- En primer lugar, el acetil-CoA se va a condensar con el malonil-CoA para generar acetoacetilo que permanecerá unido a la enzima.

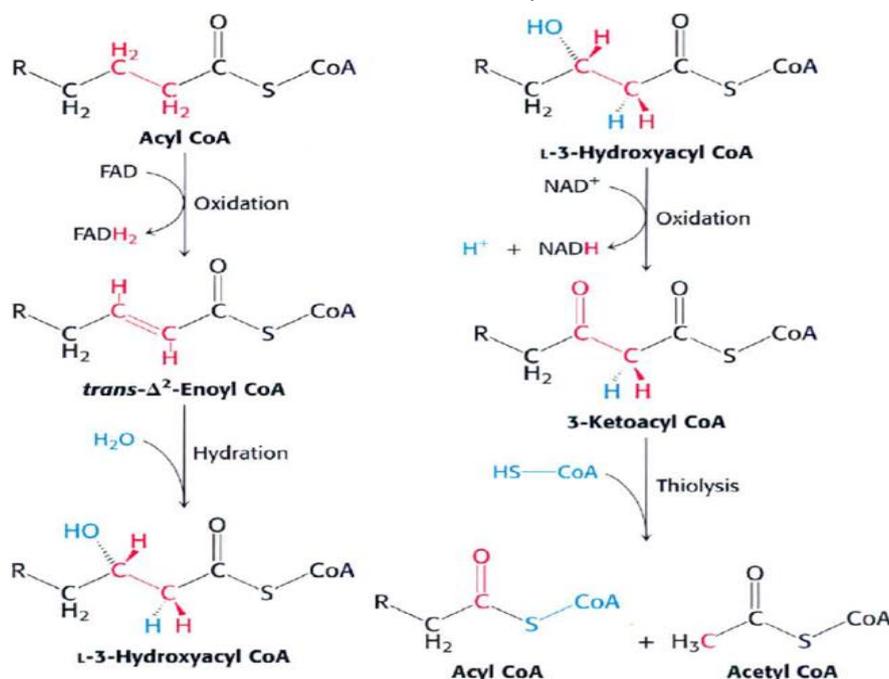


Figura 3. Esquema de la β-oxidación de los ácidos grasos saturados. Tomado de Berg JM *et al*, 2007

- A continuación, el grupo carbonilo del acetoacetilo se va a reducir a hidroxilo al mismo tiempo que un NADPH se oxida a NADP.
- Después, tiene lugar una reacción de deshidratación sobre este grupo hidroxilo que origina la aparición de un doble enlace en el interior de la molécula.
- Finalmente, se produce la reducción de este doble enlace empleando para ello los electrones de una molécula de NADPH.

Este ciclo se volverá a iniciar con la unión de otro malonil-CoA hasta que se haya formado el ácido palmítico momento en el que se liberará del complejo enzimático por una tioesterasa. La síntesis del resto de ácidos grasos requiere la participación de desaturasas y de elongasas.

El paso limitante en la síntesis de ácidos grasos es la reacción catalizada por la acetil-CoA carboxilasa. Esta enzima se ve inhibida por su producto: el malonil-CoA y cuando está fosforilada. Hormonas como el glucagón y la adrenalina promueven la fosforilación de la enzima.

REGULACIÓN DEL METABOLISMO LIPÍDICO

- Situación fisiológica:

1. Ayuno:

Durante el ayuno los niveles de glucosa en sangre bajan y como consecuencia de ello se secreta glucagón. Esta hormona va a originar la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa frenando la biosíntesis de ácidos grasos de modo que disminuirán los niveles de malonil-CoA. Dado que este metabolito es un inhibidor de la carnitina acil transferasa, esta enzima va a estar muy activa y se va a potenciar el

transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria para su oxidación. El acetil-CoA generado en la β -oxidación se utilizará en parte para la producción de cuerpos cetónicos, unos sustratos energéticos alternativos a la glucosa que serán captados desde la sangre por ciertos tejidos. El glucagón también va a causar la inhibición de la HMG-CoA reductasa reduciendo así la síntesis de colesterol.

2. Situación postprandial:

Por el contrario, en situaciones en las que hay un exceso de hidratos de carbono, se va a secretar insulina. Esta hormona va a potenciar la desfosforilación de la HMG-CoA reductasa incrementando así la producción de colesterol. Además, promoverá la desfosforilación y, por tanto, activación de la acetil-CoA carboxilasa estimulando la biosíntesis de ácidos grasos, incrementado así los niveles de malonil-CoA lo que inhibirá a la carnitina acil transferasa frenando el transporte de ácidos grasos a la mitocondria ya que en esta situación las células obtendrán energía gracias a la oxidación de la glucosa. Los triglicéridos y el colesterol sintetizados se exportarán al resto de los tejidos en forma de VLDL.

- Situación en obesidad y diabetes:

La regulación fisiológica del metabolismo se va a ver alterada en determinadas patologías como la obesidad y la diabetes.

En los pacientes obesos, cuando el tejido adiposo supera un determinado límite (definido por factores genéticos y ambientales) se desencadena una reacción inmunológica sobre el mismo, que origina una liberación masiva de citoquinas proinflamatorias. Estas citoquinas van a estimular la lipólisis de modo que el tejido adiposo va a degradar los triglicéridos almacenados a glicerol y ácidos grasos que se liberarán al torrente circulatorio.

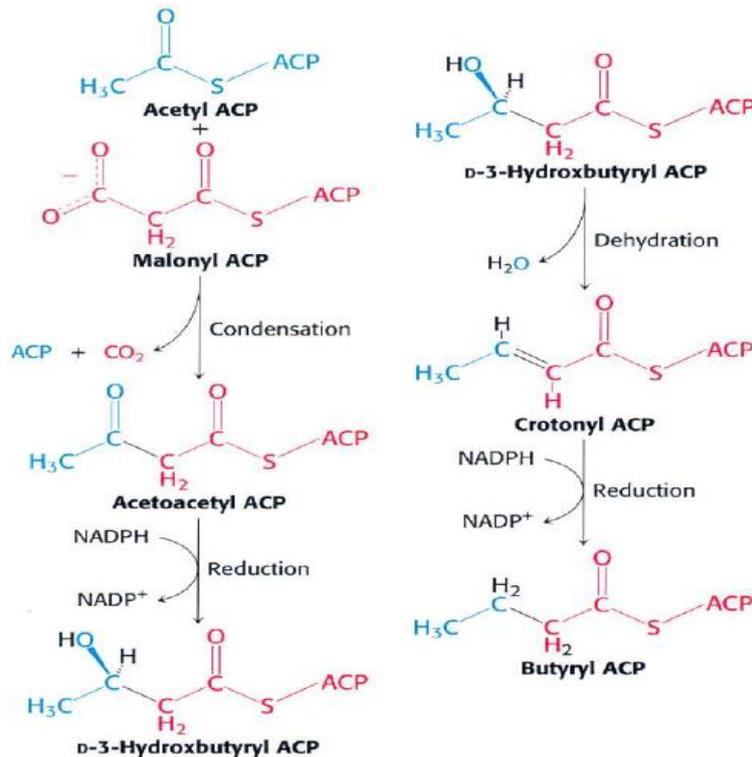


Figura 4. Esquema de la biosíntesis de los ácidos grasos saturados.
Tomado de Berg JM *et al*, 2007

Estos ácidos grasos van a ser capturados fundamentalmente por el hígado el cual los utilizará para obtener energía y para formar las VLDL. Sin embargo, cuando la cantidad de ácidos grasos captados por el hígado es excesiva, estos comienzan a almacenarse en forma de triglicéridos sobre el propio tejido hepático dando lugar a pequeñas gotas de grasa que finalmente provocarán la aparición de esteatosis hepática.

Los triglicéridos son compuestos inertes, pero sus metabolitos (diacilglicéridos y ciertos fosfolípidos) pueden alterar las rutas de señalización de los hepatocitos. Concretamente interfieren en las rutas de señalización desencadenadas por la insulina, lo que explica el fenómeno de resistencia a la insulina que se asocia a la obesidad y que finalmente puede llevar al desarrollo de diabetes tipo II.

Por otro lado, los pacientes diabéticos cursan con hiperglucemias mantenidas. El exceso de glucosa sanguínea va a ser captada por el hígado y utilizada para sintetizar colesterol y ácidos grasos. Estos dos lípidos se utilizan para formar VLDL que se exportan a la circulación. Al igual que ocurría en el caso anterior, ante un exceso de ácidos grasos en el hígado, estos comienzan a almacenarse en forma de triglicéridos sobre el propio tejido hepático lo que a la larga origina la aparición de esteatosis hepática.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Biochemistry, 6^o ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2007.
- Coleman WB, Tsongalis GJ. The Molecular Basis of Human Diseases. Molecular Pathology. 2^a ed. Barcelona: Elsevier; 2009.
- Julve J, Cirera S, Reina M. Diagnóstico de hiperquilomicronemia familiar debida a deficiencia de lipoproteinlipasa: estudio clínico, bioquímico y genético de un caso y análisis de las mutaciones identificadas en otros 10 casos. Clin Investig Arterioscler. 2010;12:191-198.
- Nelson DL, Cox MM. Lehninger. Principios de Bioquímica. 6^a ed. Barcelona: Omega; 2014.
- Simons K. The Biology of Lipids: Trafficking, Regulation, and Function. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2011.

URIANÁLISIS

Autores: Ylenia Pérez Arnaiz, Alba María Fernández Del Pozo

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Orina, Sistemático, Sedimento

FORMACIÓN DE LA ORINA

La orina es un ultrafiltrado del plasma que se produce en los riñones, concretamente en el glomérulo y a medida que circula por los túbulos, va modificando su volumen y composición. Esta varía en función de la necesidad de retener o eliminar ciertos solutos siendo la eliminación del exceso de estos y del agua, así como los productos del metabolismo y sustancias extrañas, la principal función de la orina.

En general, la orina está compuesta por un 95% de agua y un 5% de solutos disueltos en ella. La urea representa casi la mitad del total de los componentes sólidos disueltos. Es un producto de desecho metabólico producido en el hígado como consecuencia del catabolismo de las proteínas y aminoácidos. Otras sustancias orgánicas presentes en la orina son la creatinina y el ácido úrico.

URIANÁLISIS

• Definición

El término urianálisis hace referencia al conjunto de pruebas que forman parte del estudio de la orina y ayudan al cribado de infecciones del tracto urinario (ITU), enfermedad renal o enfermedades sistémicas que cursen con afectación renal. También es importante para el seguimiento y la monitorización del tratamiento de enfermedades como la diabetes mellitus y la hipertensión arterial, así como para la identificación precoz de enfermedades hepáticas, trastornos hemolíticos y trastornos del metabolismo de los hidratos de carbono.

• Generalidades

El urianálisis consta de dos partes, el estudio del sistemático de la orina o tira reactiva, y el estudio del sedimento.

En el sistemático de orina se estudian tanto aspectos físicos como químicos de esta. Entre los aspectos físicos se encuentran el color, densidad, volumen (en orina 24 horas) y entre los aspectos químicos se hallan el pH, glucosa, proteínas, sangre, leucocitos, nitritos, cuerpos cetónicos, bilirrubina, y urobilinógeno.

El estudio del sedimento consiste en la visualización al microscopio de los distintos elementos formes que pueden aparecer en orina, tras centrifugación de la muestra.

Es importante que el urianálisis se realice a la mayor brevedad posible tras la recolección de la muestra (aproximadamente entre 2-4 horas tras la recolección) debido a la labilidad de esta. En caso de estudiarse a posteriori, es conveniente su conservación en nevera a 4°C y en recipientes cerrados. Entre las alteraciones que puede sufrir la orina por una demora de su estudio encontramos:

- Destrucción de leucocitos y hematíes

- Proliferación de bacterias
- Degradación de la glucosa por consumo celular
- Aumento del pH por formación de amoníaco como resultado de la degradación bacteriana de la urea
- Oxidación de la bilirrubina y el urobilinógeno

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la recolección de la muestra. Si la orina recogida es de micción espontánea, es conveniente lavar bien los genitales y recoger solo la orina intermedia eliminando la primera y última porción de la micción. Si el paciente es portador de una sonda, la muestra recogida nunca deberá ser de la orina estancada en la bolsa o sonda, sino que debe ser una toma fresca.

• Sistemático

Comprende el estudio de parámetros fisicoquímicos de la orina. Se lleva a cabo mediante el empleo de tiras reactivas que son unas cintas de plástico o papel con almohadillas con distintas sustancias químicas que reaccionan con los distintos componentes de la orina dando un color característico medible de forma visual o automática con equipos de reflexión. El empleo de estas tiras permite conocer de forma semicuantitativa la concentración de los diferentes componentes urinarios de interés clínico.

Densidad

El estudio de la densidad aporta información acerca de la hidratación del paciente y la capacidad renal de concentrar la orina. Los valores de referencia de este parámetro son desde 1,016 hasta 1,022.

Densidades muy elevadas pueden estar provocadas por un aumento de la concentración de glucosa en la orina o glucosuria o una secreción inapropiada de hormona antidiurética. Por otra parte, la densidad puede verse disminuida por la toma de diuréticos, en hiperaldosteronismo, diabetes insípida, insuficiencia suprarrenal...

pH

Los riñones en condiciones normales producen una orina con un pH entre 5 y 8 aunque normalmente este se sitúa entre 5,5 y 6,5.

La determinación del pH urinario es útil en el manejo de cálculos en el tracto urinario al facilitar la clasificación de los cristales ya que su precipitación depende del pH. También es útil en la evaluación del equilibrio ácido-base ya que facilita la determinación de la existencia de este tipo de trastornos sistémicos.

Un pH menor de 7 es común en acidosis metabólicas, acidosis respiratoria por retención de CO₂ o por el consumo de algunas sustancias químicas o medicamentos.

Un pH mayor de 7 puede deberse a un déficit grave de potasio, ingestión de diuréticos, vómitos, alcalosis metabólica o alcalosis respiratoria por hiperventilación.

Proteínas

Este test tiene especial sensibilidad frente a la albúmina. Sin embargo, una concentración de hemoglobina elevada, como puede observarse en hematurias intensas, puede causar falsos positivos. No todas las proteinurias son patológicas y entre ellas están:

- Proteinuria transitoria o benigna donde no aparecen elementos formes en el sedimento. Se da en situaciones de estrés, ortostatismo, embarazo...
- Proteinuria prerrenal: proteinuria frecuentemente transitoria causada por situaciones que afectan al plasma antes de alcanzar el riñón.
- Proteinuria renal: puede verse producida por un síndrome nefrótico, glomerulonefritis...
- Proteinuria post renal: es consecuencia de una inflamación de la vejiga o próstata y de hemorragias en el tracto urinario.

Glucosa

En condiciones normales, la glucosa filtrada por el glomérulo se reabsorbe casi en su totalidad en el túbulo contorneado distal. Una elevación de glucosa en orina (glucosuria) aparece en hiperglucemias tan elevadas que exceden la capacidad de reabsorción del túbulo. Esta situación es común en diabetes mellitus, diabetes gestacional, síndrome de Cushing, tras una ingesta excesiva de hidratos de carbono... En otras ocasiones se encuentra glucosuria sin hiperglucemia lo que se da cuando se ve afectada la reabsorción de glucosa por los túbulos renales. Esto es conocido como glucosuria renal y se observa en la enfermedad renal en fase terminal, la cistinosis (acumulación de cristales de cistina en el interior de las células del riñón, córnea y otros tejidos) y en el síndrome de Fanconi.

Leucocitos

Los leucocitos excretados en orina son casi exclusivamente granulocitos y monocitos. Estos se ven aumentados en infecciones del tracto urinario, así como en inflamaciones renales y del tracto urogenital. Una presencia elevada de leucocitos en orina se conoce como piuria.

Sangre

La presencia de sangre en la orina es conocido como hematuria y esta puede ser provocada por distintas causas:

- Hematuria patológica: daño glomerular, daño renal no glomerular o sangrado en otras zonas del tracto urinario.
- Hematuria fisiológica: menstruación, ejercicio intenso...

Cuerpos cetónicos

La acetona, el beta hidroxibutirato y el ácido acetoacético constituyen lo que se conoce como cuerpos cetónicos. Ante un aporte insuficiente de hidratos de carbono se promueve la beta oxidación de los ácidos grasos con la consiguiente formación de estos compuestos.

Este parámetro se emplea para el seguimiento de pacientes con diabetes mellitus tipo I o insulino dependiente. También pueden aparecer cuerpos cetónicos ante deshidratación, ayuno, vómitos o dietas bajas en hidratos de carbono.

Bilirrubina

En condiciones normales, la bilirrubina conjugada (soluble en agua) no debe aparecer en orina ya que esta pasa desde el hígado al conducto biliar y de ahí, es transportada al intestino donde será reducida a urobilinógeno por las bacterias intestinales. El urobilinógeno se oxidará y se excretará como urobilina en las heces.

Cuando este ciclo de degradación se ve alterado en pacientes con hepatopatías, ictericias obstructivas o trastornos como el síndrome de Rotor o la enfermedad de Dubin-Johnson donde se altera la secreción de bilirrubina, esta bilirrubina conjugada aparece en orina.

Es importante destacar que la bilirrubina que aparece en orina no está provocada por ictericia debido a hemólisis ya que esta bilirrubina es insoluble en agua al no sufrir el proceso de glucuronidación (conjugación con ácido glucurónico) lo que permite determinar la causa de una ictericia clínica.

Urobilinógeno

El urobilinógeno es el producto final de la degradación de bilirrubina conjugada y puede aparecer en orina en cantidades muy pequeñas. Sin embargo, cuando su concentración se ve aumentada puede deberse a hepatopatías o trastornos hemolíticos.

Nitritos

La presencia de nitritos en orina es indicativa de infección bacteriana por bacterias reductoras de nitratos.

La determinación de nitritos en orina es una prueba muy específica pero poco sensible ya que un resultado positivo confirma la presencia de este tipo de bacterias, pero uno negativo no descarta la posible infección por bacterias reductoras de nitratos o incluso por bacterias reductoras, pero en una concentración no muy elevada por lo que no producen el nitrito suficiente para positivar la determinación.

- **Sedimento**

Examen microscópico de la orina cuya finalidad es la identificación de distintos elementos formes como células, cilindros, cristales y microorganismos. Se puede llevar a cabo de forma manual centrifugando la orina 3 minutos a 1500 rpm y visualizando posteriormente en microscopio óptico o en equipos automatizados que centrifugarán la orina en cubetas pequeñas y realizarán fotos que posteriormente se podrán observar en un ordenador.

Células descamativas

Las células presentes en la orina pueden proceder de los riñones o de cualquier otro punto del aparato urinario, incluyendo los genitales externos.

Es habitual la presencia de estas células en la orina como consecuencia de una descamación fisiológica del epitelio urinario. Es por ello que se recomienda la recogida de la

fracción intermedia de la orina ya que así se evita la presencia de una elevada cantidad de estas células impidiendo la visualización de otros elementos.

Las células descamativas pueden proceder de distintas partes del tracto urinario presentando una morfología diferente según éste:

1. Células epiteliales escamosas:

Proceden de los revestimientos de la vagina y la uretra femenina, así como de la porción inferior de la uretra masculina. Carecen de importancia patológica.

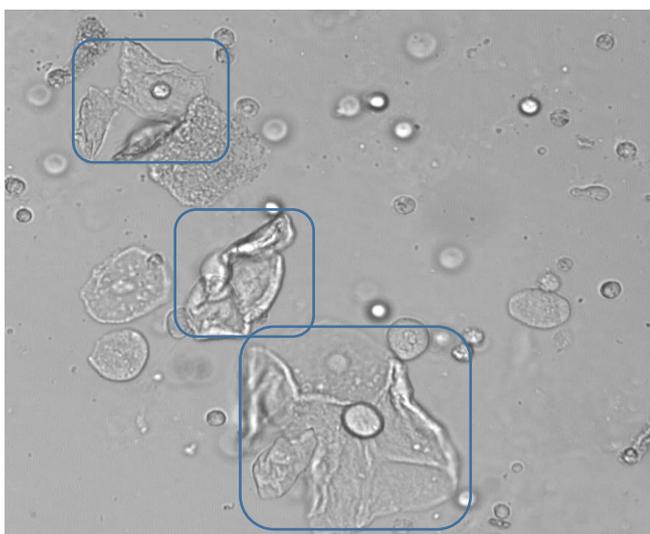


Figura 1. Células epiteliales escamosas en orina. Tomada de: Menasoft. Servicio de Bioquímica clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre

2. Células transicionales:

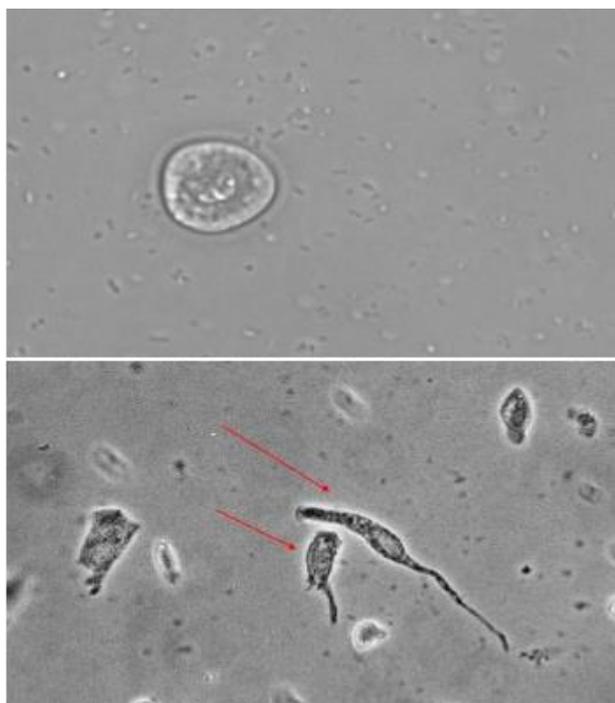


Figura 2. Células transicionales en orina. Tomada de: Menasoft. Servicio de Bioquímica clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre

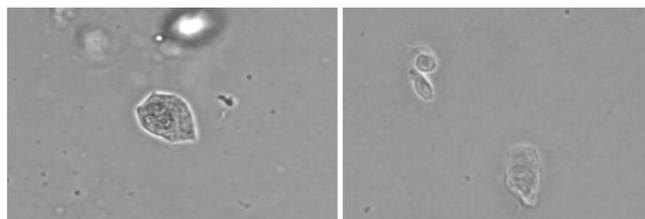


Figura 3. Células renales en orina. Tomada de: Menasoft. Servicio de Bioquímica clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre

Originarias del revestimiento de la pelvis renal, los cálices renales, la uretra y la vejiga y de la porción superior de la uretra masculina.

3. Células renales:

Son las células de revestimiento que poseen un mayor significado patológico al proceder de los túbulos renales.

4. Células atípicas

Entre estas células atípicas podemos encontrar células de transición binucleadas, células vacuoladas o distintas células con atipias morfológicas que pueden ser indicativas de infecciones virales o procesos neoplásicos. La visualización de estas células en la orina debe reflejarse en el informe.

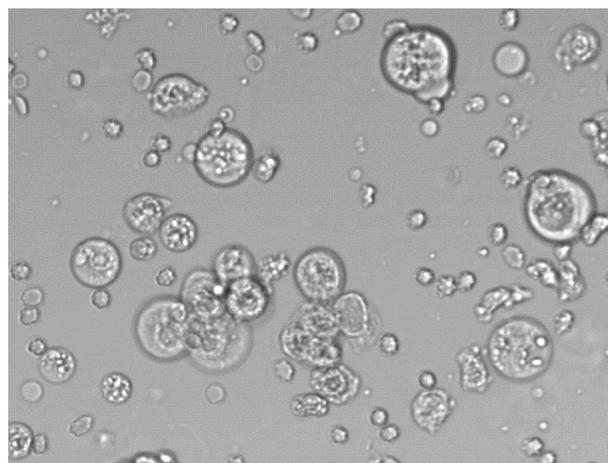


Figura 4. Células atípicas en orina. Tomada de: Menasoft. Servicio de Bioquímica clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre.

Hematíes

Es necesario confirmar la hematuria con la observación de al menos tres hematíes por campo, aunque en ocasiones, ante hemólisis marcadas es probable no observar ninguno. La hematuria puede ser microscópica, si esta es solo objetivable al microscopio siendo el color de la orina normal, o macroscópica, si la orina es coloreada y se observan más de 50 hematíes por campo.

Los hematíes pueden adquirir distintas formas según la osmolaridad de la orina. En orinas hipotónicas los hematíes se hinchan y se lisan liberando su hemoglobina y dejando solo la membrana celular (hematíes fantasma). En orinas hipertónicas pierden su contenido celular reduciendo su tamaño. También pueden aparecer hematíes dismórficos que presentan una alteración de la morfología. Es importante

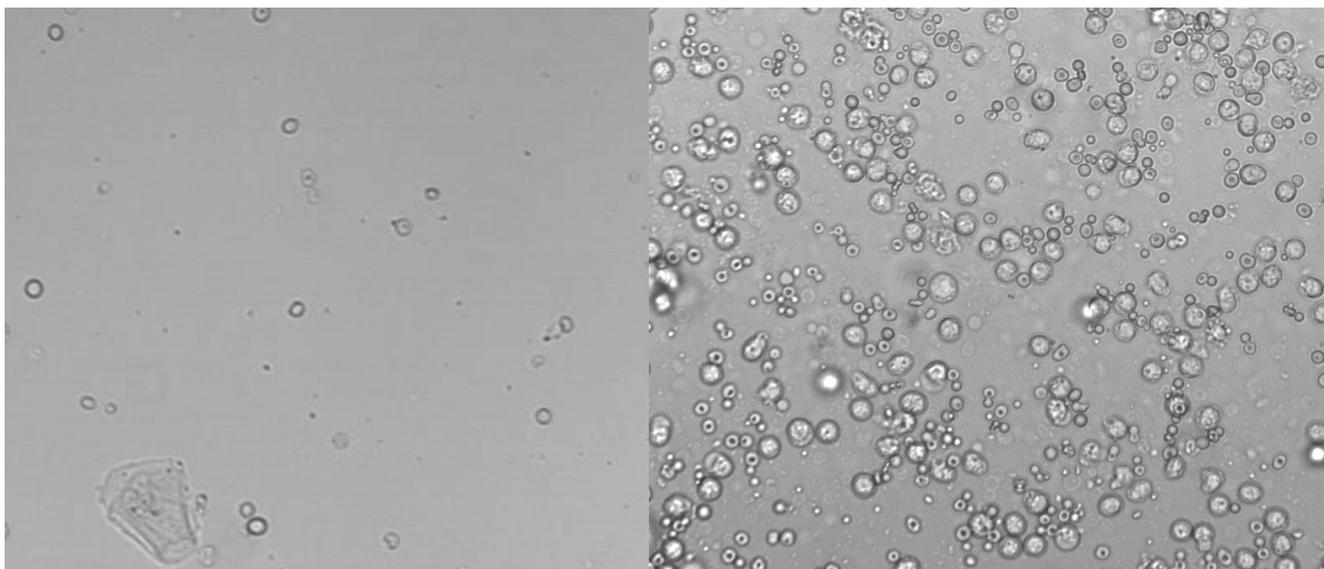


Figura 5. Hematíes en orina. A la izquierda, hematíes de aspecto normal. A la derecha, hematíes dismórficos. Tomada de: Menasoft. Servicio de Bioquímica clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre

informar de su presencia si esta es superior a un 20% ya que es indicativo de alteración glomerular.

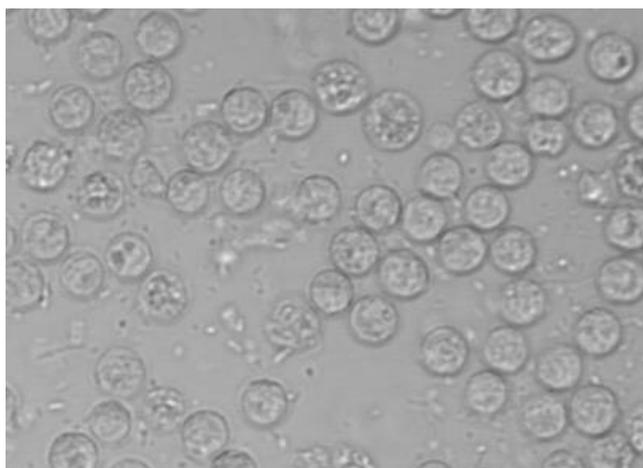


Figura 6. Leucocitos en orina. Tomada de: Menasoft. Servicio de Bioquímica clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre

Leucocitos

Los leucocitos se caracterizan por la granulosidad de su citoplasma y la presencia de núcleo. A veces se pueden encontrar formando agregados leucocitarios.

Espermatozoides

Se identifican con facilidad por sus cabezas ovaladas y flagelos largos. En hombres, un elevado número de espermatozoides en orina puede ser indicativo de eyaculación retrógrada.

Microorganismos

Es bastante habitual la presencia de ciertos agentes patógenos en la orina. Entre ellos están:

1. Bacterias:

Para que su hallazgo sea relevante su presencia debe ir unida a la aparición de leucocitos siendo sugestivo de ITU.

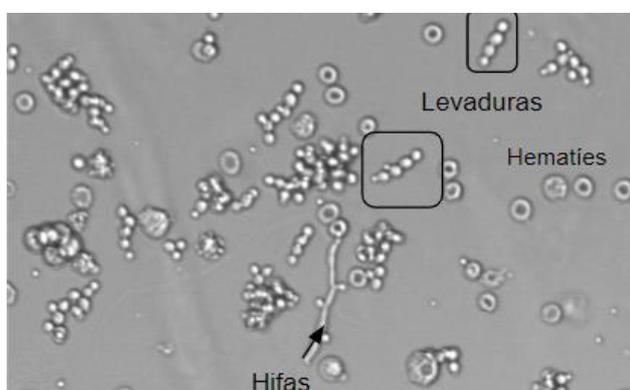


Figura 7. Levaduras y filamentos de hongos (hifas) en orina. Tomada de: Menasoft. Servicio de Bioquímica clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre

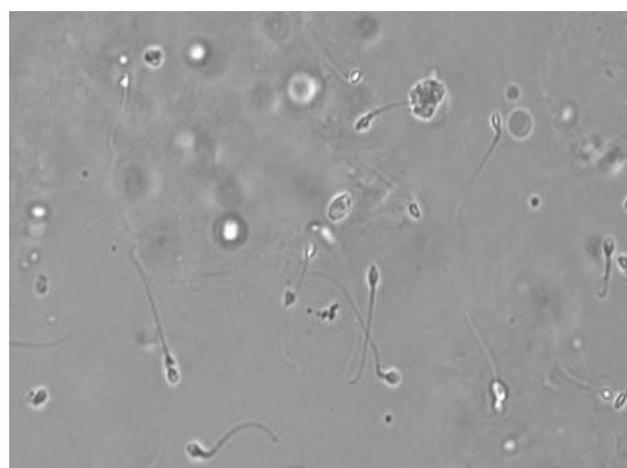


Figura 8. Espermatozoides en orina. Tomada de: Menasoft. Servicio de Bioquímica clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre

2. Hongos:

Se pueden encontrar tanto en forma de levaduras (uniformes, ovoides, a veces se aprecia la gemación) como en forma de filamentos o hifas.

3. Parásitos:

El más frecuente es *Trichomonas vaginalis*, un agente de transmisión sexual. Se caracterizan por la presencia de flagelos en sus extremos y su movilidad en el fresco. También se pueden encontrar huevos de parásitos, como *Enterobius vermicularis*, aunque es poco frecuente.

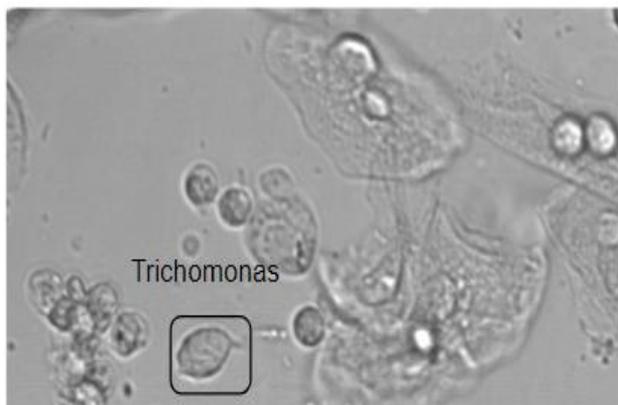


Figura 9. *Trichomonas vaginalis* en orina. Tomada de: Menasoft. Servicio de Bioquímica clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre

Cilindros

El principal componente de estos elementos formes es la glucoproteína de Tamm-Horsfall. Se forman estos acúmulos en los túbulos renales como consecuencia de la precipitación de esta proteína y a ellos se pueden adherir otros elementos como células u proteínas dando lugar a los distintos cilindros conocidos (hialino, granuloso, céreo, leucocitario, eritrocitario, graso).



Figura 10. Cilindro céreo en orina. Tomada de: Menasoft. Servicio de Bioquímica clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre

Moco

Las glándulas y las células epiteliales del tracto genitourinario inferior y las células epiteliales de los túbulos renales segregan un material proteico conocido como moco. Este, en ocasiones, aparecen en orina sin tener relevancia clínica.

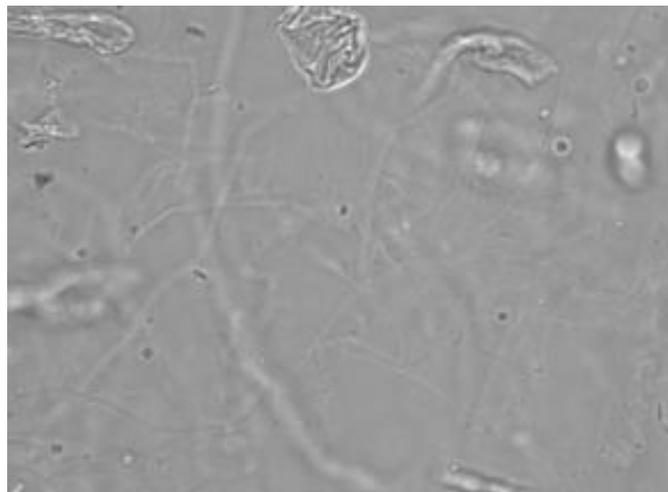


Figura 11. Moco en orina. Tomada de: Menasoft. Servicio de Bioquímica clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre

Cristales

Cuando la orina está sobresaturada con un compuesto cristalino o cuando se alteran las propiedades de solubilidad se forman cristales. Si la precipitación tiene lugar en el riñón o en otra forma del aparato urinario estos cristales se conocen como cálculos.

La formación de los cristales depende del pH de la orina; según este, precipitarán unos u otros. En orinas ácidas es común encontrar ácido úrico, uratos amorfos, urato sódico y oxalato cálcico; mientras que en orinas básicas aparecerán fosfato triple, fosfatos amorfos, carbonato cálcico, biurato amónico y urato amónico. Estos cristales no son patológicos. Sin embargo, en otras ocasiones aparecen cristales que sí están asociados a patologías entre los que se encuentran la cistina, tirosina, colesterol, bilirrubina...

Artefactos

Por último, es frecuente encontrar orinas contaminadas en mayor o menor medida. Algunos de los contaminantes más comunes son: almidón (aparece cuando se emplea fécula de maíz como los polvos de talco), fibras textiles o contaminación fecal.

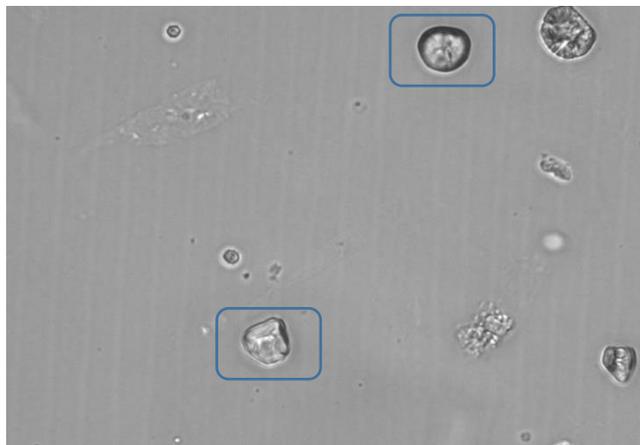


Figura 13. Artefactos de almidón en orina. Tomada de: Menasoft. Servicio de Bioquímica clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre

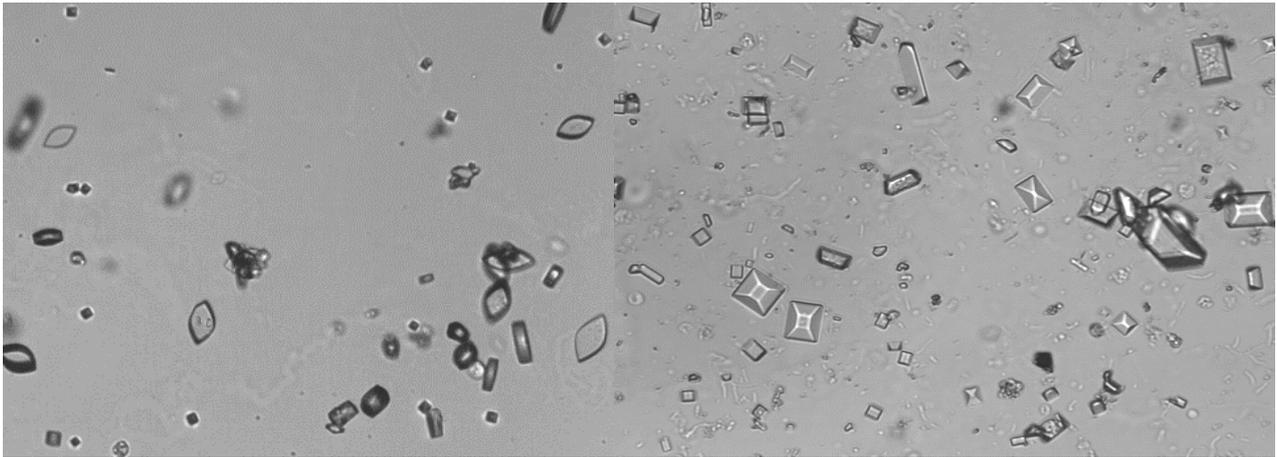


Figura 12. A la izquierda, cristales de ácido úrico en orina. A la derecha, cristales de fosfato triple en orina. Tomadas de: Menasoft. Servicio de Bioquímica clínica. Hospital Universitario 12 de Octubre

BIBLIOGRAFIA GENERAL

- Campuzano Maya G, Arbeláez Gómez M. El Uroanálisis: un gran aliado del médico. *Rev Urol Colomb.* 2007; 16(1):67-92.
- González Hernández A. Enfermedad renal. En: González Hernández A. *Principios de bioquímica clínica y patología molecular.* Barcelona: Elsevier; 2010. p. 247-260.
- Katrina C, Holly H, Adeera L. Evaluación de laboratorio de la enfermedad renal: tasa de filtración glomerular, análisis de orina y proteinuria. En: Brener y Rector. *El riñón.* 10ª ed. Barcelona: Elsevier; 2018. p. 780-803.
- Staton BA, Koeppen BM. Transporte de agua y solutos a lo largo de la nefrona: función tubular. En: Berne, Levy. *Fisiología.* 6ª ed. Barcelona: Elsevier; 2009. p. 578-593.
- Strasinger SK, Di Lorenzo MS. Examen químico de la orina. En: Strasinger SK, Di Lorenzo MS. *Análisis de la orina y de los líquidos corporales.* 5ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 53-80.
- Strasinger SK, Di Lorenzo MS. Examen microscópico de la orina. En: Strasinger SK, Di Lorenzo MS. *Análisis de la orina y de los líquidos corporales.* 5ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 81-128.

BIOQUÍMICA DEL ENDOTELIO VASCULAR

Autores: Elena Ana López Jiménez, Silvia Díaz Díaz

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Endotelio, Disfunción endotelial, Homeostasis tisular

EL ENDOTELIO: ESTRUCTURA

Los nutrientes transportados por el sistema circulatorio son extravasados a los tejidos para cubrir las necesidades de los mismos; de igual forma, los residuos son recogidos y después eliminados por filtración en hígado y riñones. Este transporte de sustancias y células entre la sangre y el tejido circundante es controlado por el endotelio vascular.

El endotelio vascular es una capa delgada de células escamosas simples que recubren la superficie interior de todo el sistema cardiovascular, desde las arterias y venas más grandes hasta los capilares más pequeños.

Constituye un límite crítico entre la sangre circulante y los tejidos subyacentes. En los vasos más grandes, como las venas y las arterias, la pared del vaso consta de células endoteliales (CE), células de músculo liso y fibras elásticas. En los capilares, sin embargo, las CE constituyen toda la pared de los vasos sanguíneos. Crean una gran superficie con una permeabilidad relativamente alta para el intercambio de gases, fluidos, electrolitos y macromoléculas.

El endotelio ha sido pesado (3,5-4,5 Kg) y medido, con una superficie total equivalente a seis canchas de tenis (más de 1000 m²). Es considerado el mayor "órgano virtual" del organismo, multifuncional, parcelado y especializado¹.

- **Heterogeneidad fenotípica de las CE**

Existe una diferencia entre arterias, venas y capilares, así como dentro de una variedad de lechos de vasos de órganos específicos^{2,3}.

El endotelio de las arterias es continuo, con un importante papel a la hora de regular el tono muscular de la capa subyacente, y se encuentra preparado para soportar una presión mayor. Las células se encuentran alineadas en la dirección del flujo, para minimizar las fuerzas de rozamiento ejercidas por la sangre y fuertemente unidas.

Las células de las venas, por el contrario, aunque tampoco permiten el transporte de nutrientes, se encuentran dispuestas de forma más regular, sin una dirección concreta dado que la presión a la que se encuentran expuestas es mucho menor. Esta baja presión obliga, no obstante, a la presencia de válvulas a intervalos regulares para impedir el reflujo de la sangre.

Hay tres tipos de capilares: capilares continuos, fenestrados y discontinuos.

Los capilares continuos son conductos de baja permeabilidad ubicados en el músculo esquelético, corazón, tejido adiposo, pulmón, piel y el sistema nervioso central, donde los espacios intercelulares son estrechos y la membrana basal es continua para las CE.

Los capilares fenestrados se encuentran en el plexo coroideo del cerebro y los órganos endocrinos donde existen hendiduras intercelulares entre las CE vecinas, pero la membrana basal que rodea a las CE es continua.

En el hígado, la médula ósea y el bazo, los capilares discontinuos (sinusoides) muestran espacios tanto en la capa endotelial como en la membrana basal, por lo que proporcionan la mayor permeabilidad.

Además de la diferencia entre arterias, venas y capilares, se ha descrito heterogeneidad endotelial entre distintas regiones del mismo órgano. Por ejemplo, ~ 84% de los receptores vasculares de las CE de los islotes son exclusivos del islote y no se detectan en las CE del tejido pancreático exocrino circundante⁴.

La heterogeneidad en las células endoteliales está, además, fuertemente vinculada a factores intrínsecos (por ej., factores genéticos) y a factores extrínsecos, tales como la localización anatómica, los mediadores solubles, el contacto célula-célula, las interacciones célula-matriz, el pH, la pO₂, las fuerzas mecánicas, etc.

- **Glucocáliz endotelial**

La membrana plasmática apical o luminal de la CE lleva el sitio del glucocáliz (GCX), red compleja de macromoléculas⁵. El glucocáliz tiene una estructura multicapa que reduce el contacto de la CE con los componentes sanguíneos celulares y macromoleculares. La mayor parte del glucocáliz está formado por glucoproteínas y proteoglicanos (PG)⁶. Su composición y dimensiones fluctúan con las fuerzas de cizallamiento cambiantes de la sangre turbulenta, lo que lleva a la pérdida y resíntesis de los constituyentes de GCX. La síntesis del glucocáliz es un proceso complejo que implica múltiples vías enzimática. El GCX participa en diferentes funciones vasculares.

FUNCIONES DEL ENDOTELIO VASCULAR

Las CE desempeñan importantes roles en una variedad de procesos patológicos y fisiológicos. La mayoría de las investigaciones se han centrado en las funciones reguladoras de la disfunción endotelial en la aterosclerosis, enfermedad de las arterias coronarias, accidente cerebrovascular, hipertensión, enfermedades relacionadas con la angiogénesis y complicaciones vasculares asociadas a la diabetes, sin embargo, el endotelio vascular posee importantes funciones en el mantenimiento de la homeostasis metabólica sistémica mediante el control del transporte transendotelial y la secreción de reguladores metabólicos. La desregulación de los procesos endoteliales da como resultado una alteración metabólica, que a su vez exagera la disfunción endotelial y vascular y,

probablemente, actúa como un circuito de retroalimentación para el desarrollo de trastornos metabólicos.

El endotelio podría definirse como un órgano con funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas, entre las que se encuentran:

- **Intercambio de nutrientes: Barrera selectiva.**

El intercambio de nutrientes y compuestos entre el interior de los vasos sanguíneos y el tejido circundante se produce principalmente en los capilares con excepción del intercambio de oxígeno que tiene lugar en gran medida en las arteriolas.

- Permeabilidad basal: se produce principalmente mediante el transporte paracelular que tiene lugar entre las células, especialmente cuando se trata de endotelio fenestrado o discontinuo, pero también transcelularmente mediante las caveolas y los orgánulos vesículo-vacuolares (VVO).
- Permeabilidad inducible: tiene lugar principalmente durante los procesos de inflamación, se produce mediante la apertura de canales transendoteliales y mediante vacuolas².
- Transportadores:
 - Transporte de glucosa: GLUT-1 y GLUT-4 se expresan en las células endoteliales. Se han detectado en gran cantidad en la barrera hematoencefálica.
 - Transporte de aminoácidos: Se han identificado numerosos transportadores de aminoácidos en las células endoteliales, destacándose el sistema transportador de aminoácidos catiónicos, particularmente el de la L-arginina, sustrato para la síntesis de NO.

- **Regulación del tono**

Debido a su ubicación estratégica, la CE vascular es capaz de detectar cambios hemodinámicos y señales transmitidas por la sangre y responder mediante la liberación de sustancias vasoactivas. En condiciones fisiológicas, los factores de contracción y relajación derivados del endotelio están equilibrados, de modo que la homeostasis vascular se mantiene marginalmente a favor de la vasodilatación⁷.

Desde el punto de vista de la regulación del tono vascular, el endotelio es considerado un tejido paracrino que sintetiza sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras que afectan directamente el estado de relajación/contracción del músculo liso adyacente. Para la regulación del tono vascular debe de haber un equilibrio de fuerzas vasoconstrictoras y vasodilatadoras generados por el endotelio.

Factores vasodilatadores

Las sustancias vasodilatadoras pueden ser producidas y liberadas a través de la estimulación de las células endoteliales por fuerzas mecánicas (tensión de cizallamiento o *shear stress*) o la activación de receptores de superficie por agonistas específicos (acetilcolina, bradiquinina, adenina nucleótido difosfato, sustancia P, etc.).

1. Óxido nítrico (NO):

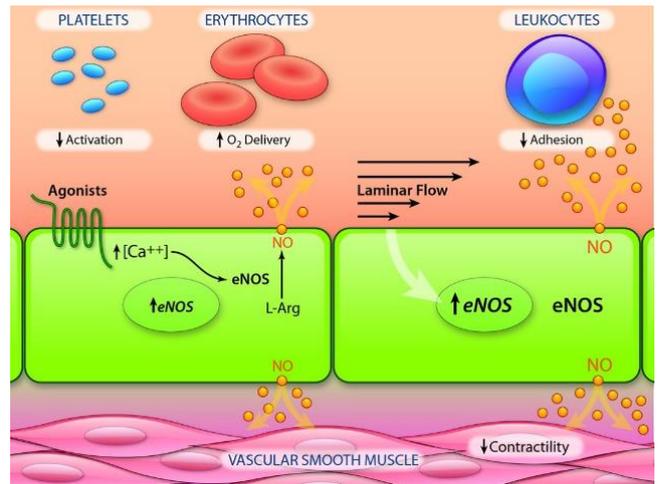


Figura 1. Papel endotelial del NO. Tomado de: Gimbrone MA Jr *et al*, 2016

La producción de óxido nítrico constituye la base del mecanismo de relajación del endotelio. El óxido nítrico es sintetizado por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) por oxidación de L-arginina, síntesis que es dependiente de la concentración de Ca²⁺ intracitoplasmática⁸.

Si bien eNOS está activa constitutivamente, su actividad puede ser incrementada por diversos factores como el *shear stress*, hipoxia o la acción de agonistas que inducen el aumento de calcio intracitoplasmático (Ej.: trombina o bradiquinina). Una vez sintetizado, el NO difunde hacia las células musculares lisas por difusión, estimulando la guanilato ciclasa (GC), la cual aumenta los niveles de cGMP y produce la relajación del músculo liso. Además, el NO formado difunde hacia el lumen del vaso donde inhibe la adhesión de leucocitos y plaquetas sobre el endotelio.

Existen tres formas de la NO sintetasa: tipo I o neuronal (nNOS); tipo II o inducible (iNOS), cuya actividad es independiente de la concentración de Ca²⁺, y tipo III o endotelial (eNOS) que es específica del endotelio.

2. Prostaciclina (PGI₂):

Es un metabolito del ácido araquidónico (AA) producido por la ciclooxigenasa. La PGI₂ no es sintetizada en forma constitutiva por el endotelio por lo que no regula el tono basal. Se libera en sitios de alteración vascular en respuesta al *shear stress* o la hipoxia; tiene un efecto sinérgico con el NO. A diferencia del NO, produce su efecto vasodilatador a través de receptores específicos que están presentes en la membrana de los músculos lisos del vaso. Su acción genera un aumento del cAMP facilitando la disminución de Ca²⁺ intracelular, induciendo la relajación muscular y regulando de esta forma la vasoconstricción.

3. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF):

Bajo esta denominación se incluyen un grupo de compuestos generados por el endotelio que inducen vasorelajación. Si bien la estructura química no está totalmente establecida, esta función es llevada a cabo por los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) que son

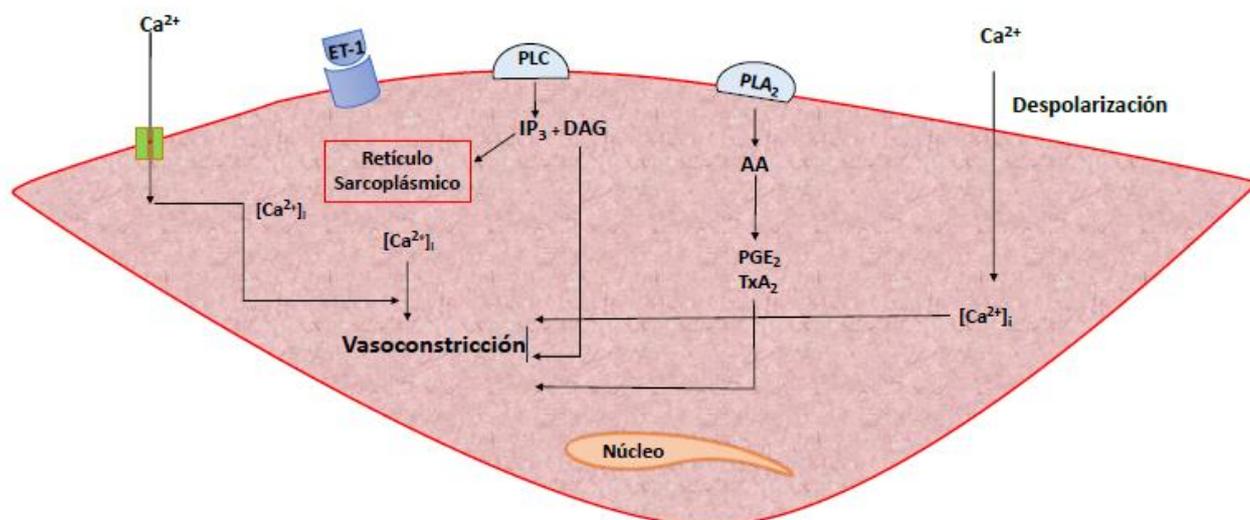


Figura 2. Vías de señalización de la endotelina-1 en el músculo liso vascular. Tomada de Paredes-Carbajal M.C. *et al*, 2020

metabolitos del AA generados por la enzima P450 epoxigenasa; estos EETs actúan sobre las células del músculo liso abriendo los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} e hiperpolarizando la membrana. La importancia de este factor de relajación se incrementa a medida que el diámetro de las arterias disminuye.

Factores vasoconstrictores

El endotelio puede producir sustancias vasoconstrictoras, como la prostaglandina H_2 , la endotelina-1, el tromboxano A_2 (TXA_2) o los aniones superóxido.

1. Endotelinas:

Son una familia y formada por 3 péptidos de 21 aminoácidos ET-1, 2 y 3, con una estructura peptídica muy similar.

La endotelina-1 (ET-1) es el vasoconstrictor más potente hasta ahora conocido por el hombre, incluso es 10 veces más potente que la angiotensina II. La mayor parte de la ET-1 es liberada contra la pared del vaso, por lo que los niveles plasmáticos no reflejarían su concentración local.

El regulador más potente de la producción y liberación de ET-1 es el flujo sanguíneo. Un incremento en el flujo sanguíneo resulta en vasodilatación porque aumenta la producción y liberación de NO y disminuye la síntesis y liberación de ET-1 por parte de la CE. La insulina, la trombina, las lipoproteínas de baja densidad, la angiotensina II, la vasopresina, la IL-1, la endotoxina, la glucosa, la ciclosporina, la hipoxia, el shear stress bajo incrementan la producción de ET-1. Inhiben la producción de ET-1 el shear stress alto, el NO, la PGI_2 y la heparina.

La ET-1 en condiciones patológicas se incrementa su producción, tanto es así que se ha demostrado su elevación en enfermedades agudas como crónicas, podemos señalar como es el caso de la hipertensión pulmonar, infarto agudo de miocardio, arterioesclerosis, lupus, sepsis, cirugías, cáncer, diabetes mellitus, insuficiencia cardíaca entre otras.

Se han identificado dos tipos específicos de receptores de endotelinas denominados receptores de tipo A y B. Las células del endotelio expresan en mayor cantidad

receptores de tipo B, siendo su mayor acción sobre esta célula la vasodilatación. La célula del músculo liso vascular expresa mayor cantidad de receptores de tipo A, logrando en estas células vasoconstricción.

La potencia de ET-1 es mayor sobre los receptores de tipo A que la ET-2 y ET-3. La potencia de ET-1 sobre receptores de tipo B es igual a ET-2 y ET-3.

- **Hemostasia y coagulación**

El endotelio sano es antiadherente; los elementos formes de la sangre circulan sin adherirse al endotelio, debido a la liberación en forma continua de NO. En presencia de citoquinas pro inflamatorias, el endotelio expone un conjunto de receptores, denominados moléculas de adhesión celular (CAM), que mediarán las interacciones CE-CE, CE-matriz, plaquetas-CE y leucocitos-CE⁸.

Moléculas de adhesión celular (CAM)

Es un sistema formado por proteínas y receptores adhesivos que juegan papeles importantes en los procesos de embriogénesis, crecimiento y diferenciación celular, e inflamación. Estas moléculas de adhesión están aumentadas a nivel plasmático en situaciones inflamatorias, especialmente en sepsis, y se las ha propuesto como marcadores de activación endotelial.

Las CAM se dividen en cuatro grupos principales: superfamilia de las inmunoglobulinas, integrinas, selectinas y caderinas.

Superfamilia de inmunoglobulinas

Es el grupo más grande de CAM. Forman el 50 % de las glicoproteínas de la membrana leucocitaria. Cada proteína contiene una serie de dominios similares a las Ig. Son contra receptores de las integrinas de los leucocitos. A este grupo pertenecen: moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1, ICAM-2), moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM) y las moléculas de adhesión plaquetas-célula endotelial (PECAM). Los receptores ICAM-2 y PECAM (CD31) se expresan en forma constitutivas, y VCAM-1 e ICAM-1 son inducibles por citoquinas. Estas moléculas

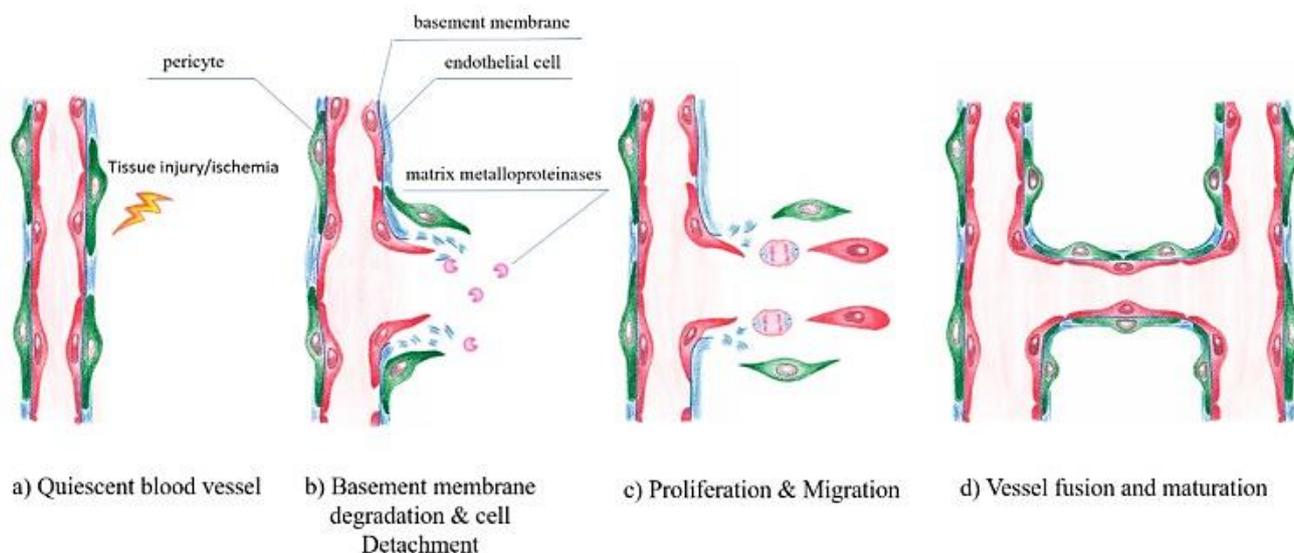


Figura 3. Proceso de angiogénesis vascular. Tomada de Krüger-Genge A *et al*, 2019

participan en la activación y migración de los leucocitos a los tejidos.

1. Integrinas

Son proteínas de membrana que tienen dos subunidades, la α y la β , que participan en las interacciones célula-célula y célula-matriz. Cada integrina puede unirse a más de un ligando. Pertenecen a este grupo la glicoproteína IIb-IIIa (receptor del fibrinógeno), el receptor de vitronectina ($\alpha V\beta 3$), el receptor de fibronectina ($\alpha 5\beta 1$) y el receptor de colágeno (GP Ia-IIa).

Selectinas

Son moléculas de adhesión que se exponen en las superficies celulares y que se nombran de acuerdo a la célula en que estén presentes: E-selectina (selectina endotelial, sólo presente en CE), P-selectina (selectina plaquetaria, presente en plaquetas y CEs) y L-selectina (selectina leucocitaria). Interaccionan con leucocitos o con oligosacáridos sialilados o fucosilados sobre la superficie de la célula endotelial. La E-sel se expresa cuando la CE es activada por citoquinas inflamatorias e interviene en el rolling de los leucocitos.

Cadherinas

Promueven la adhesión célula-célula mediada por calcio. La unión se hace entre una molécula de VE-Cad con otra VE-Cad. Es esencial para la estabilidad y el contacto CE-CE. *Junctional Adhesion Molecule* (JAM) es una cadherina que interviene en el nexo entre las células endoteliales, mientras que CD99 y CD99L intervienen en la extravasación de leucocitos.

En condiciones fisiológicas normales, las células endoteliales participan en el mantenimiento de la fluidez sanguínea y evitan la formación de trombos, por sus acciones anticoagulantes, antiagregantes plaquetarias y fibrinolíticas. El NO y la PGI₂ aumentan los niveles intracelulares de cGMP y cAMP, respectivamente, inhibiendo así, la adhesión y la agregación plaquetarias. El tPA, también sintetizado por el endotelio, promoviendo así la fibrinólisis mediante la activación del plasminógeno a

plasmina. Por otra parte, el endotelio también sintetiza el factor de von Willebrand, el TXA₂, la fibronectina, el factor V y el inhibidor del tPA, que tienen actividad proagregante, protrombótica y antifibrinolítica.

• Inflamación y regulación inmunológica

Las células endoteliales son críticas para la extravasación de las células inmunes a las zonas infectadas. El proceso de inflamación, típicamente inducido por citoquinas como el TNF α , induce respuesta en gran número de tejidos al activar la ruta metabólica del NF κ B. En las células endoteliales estos cambios incluyen la exposición a la luz del vaso de P-selectinas que interaccionan con las ICAM de las células inmunes, ralentizándolas, haciéndolas rodar y finalmente provocando su extravasación⁹. Todo este proceso de reclutamiento se produce principalmente en las vénulas postcapilares, una vez las células blancas han sido activadas por las citoquinas emitidas por la zona afectada, pudiendo pasar por los huecos entre células o incluso a través de los canales transendoteliales que atraviesan la célula endotelial en algunos vasos³.

• Angiogénesis

En condiciones fisiológicas normales, la CE permanece en un estado inactivo. Sin embargo, en respuesta a una lesión tisular o condiciones hipóxicas, se caracterizan por protagonizar un crecimiento del sistema vascular por extensión de vasos preexistentes denominado angiogénesis¹⁰. En este proceso una de las células modifica su expresión y pasa a ser "líder", expresando metaloproteinasas que remodelan la matriz extracelular y le permiten migrar. Gracias a las citoquinas expresadas por esta célula, las que le siguen proceden a dividirse y reorganizarse tras ella extendiendo así un nuevo vaso en la dirección desde donde llegan las señales de falta de riego. Una vez instaladas regeneran la matriz secretando fibronectina¹¹. A diferencia del desarrollo embrionario, la angiogénesis del adulto está estrechamente relacionada con una serie de procesos fisiológicamente relevantes, por ejemplo, la cicatrización de heridas o afecciones

fisiopatológicas como trastornos inflamatorios, cáncer o diabetes mellitus.

- **Homeostasis tisular**

Se denomina homeostasis al mantenimiento en un rango relativamente estrecho de la composición y propiedades en un medio, el organismo en este caso. Para lograrlo el endotelio recurre a las propiedades ya comentadas, detección de la situación del tejido y el contenido en sangre, seguido de la propia emisión de señales celulares y adecuación de la permeabilidad correspondiente de forma coordinada. Aunque buena parte del intercambio entre el seno del vaso y las células fuera del mismo se produce mediante vías dirigidas por gradiente de los compuestos transportados como H₂O, solutos pequeños o incluso lipoproteínas también hay un importante transporte activo con participación de mecanismos propios de las células endoteliales. Cuando el transporte pasivo no se produce en la extensión necesaria estos mecanismos activos entran en juego para compensar desviaciones en la homeostasis. Estos procesos incluyen la formación de vacuolas de clatrina o captación por receptor de macromoléculas (BAUM et al.).

Asimismo, dado que el sistema vascular es la base de la nutrición tisular, juega un papel fundamental en el desarrollo de órganos. No sólo a la hora de formarse durante el desarrollo fetal, sino también en cualquier proceso de remodelación. Las células endoteliales participan activamente en la destrucción y reconstrucción de la matriz extracelular y preceden cualquier aumento o disminución en el tamaño de un órgano, adaptando previamente la distribución del sistema vascular en la zona¹².

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

El endotelio normal se caracteriza por un fenotipo vasodilatador, tromborresistente y antiinflamatorio.

Hay endotelio en todo el lecho vascular pero el que disfunciona y es responsable de patología es el arterial.

El término activación se considera como la capacidad de la célula endotelial de adquirir nuevas funciones sin evidencia de daño o división celular.

Se define disfunción endotelial como el conjunto de cambios patofisiológicos en la estructura y función de la CE que ocasionan la pérdida del equilibrio: antitrombótico-protrombótico, vasorelajación- vasoconstricción, inhibición y estimulación de los factores de crecimiento y antiinflamatorio-pro inflamatorios.

La disfunción endotelial usualmente comienza como la respuesta fisiológica a un estímulo dado que luego se torna excesiva o descontrolada por un defecto en la regulación de la cascada inflamatoria.

Un endotelio sano muestra un fenotipo vasodilatador que consiste en altos niveles de vasodilatadores como óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂) y niveles bajos de especies reactivas de oxígeno (ROS) y ácido úrico. Un endotelio sano también tiene un fenotipo anticoagulante que consiste en niveles bajos de inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), factor de von Willebrand (vWF) y

P-selectina. Puede haber muy poca inflamación, como lo indican los bajos niveles de molécula de adhesión celular vascular soluble (sVCAM), Molécula de adhesión intercelular soluble (sICAM), E-selectina, proteína C reactiva (PCR), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). Finalmente, la población de células progenitoras endoteliales (CPE, indicativo de la capacidad de reparación vascular) es alta; mientras que los niveles de micropartículas endoteliales (EMP) y células endoteliales circulantes (CEC), indicativos de estrés / daño endotelial, son bajos. En el caso de un endotelio disfuncional, las características fenotípicas incluyen vasodilatación alterada, aumento del estrés oxidativo / ácido úrico, radicales de peróxido de lípidos, nitrotirosina y óxido nítrico, y un fenotipo procoagulante y proinflamatorio con capacidad de reparación vascular disminuida y mayor número de EMP y CEC⁹ (Figura 4).

- **Causas de la disfunción endotelial:**

Las causas pueden ser numerosas, entre ellas se encuentran:

Acumulación en el flujo sanguíneo de ciertos nutrientes en exceso

Es el caso de la diabetes o de la aterosclerosis. La primera, debilitante del endotelio, podría incluso inducir la segunda.

Edad

La edad es un factor de disfunción endotelial.

Hipertensión

Padecerla de forma continua es otra de las causas que inducen un estrés constante sobre el endotelio. Parece ser simultáneamente causa y consecuencia de la disfunción endotelial.

Obesidad

No sólo es causa de hipertensión, niveles excesivos de lípidos e insulina en sangre, sino que los niveles altos de adipocinas emitidos por los adipocitos aumentan el riesgo de sufrir los problemas propios de la disfunción endotelial.

Isquemia

En un intento de solucionar la falta de riego se iniciará un proceso angiogénico de emergencia, lo que impone un gran nivel de estrés sobre el endotelio, lo que a su vez puede derivar en disfunción de este.

- **Consecuencias de la disfunción endotelial:**

Aneurisma

Supone la rotura del vaso sanguíneo. Habitualmente este es un caso extremo y varios factores deben acumularse en una sección especialmente débil, por malformación congénita, para que tenga lugar. No obstante, la rotura espontánea de un vaso sanguíneo, o aneurisma, típicamente en arteria debido a la alta presión, es una patología de una mortalidad extremadamente alta.

Patologías crónicas

Tanto la diabetes como la isquemia provocan un fallo en el funcionamiento de las uniones entre las células endoteliales. Como resultado se pierde coordinación entre

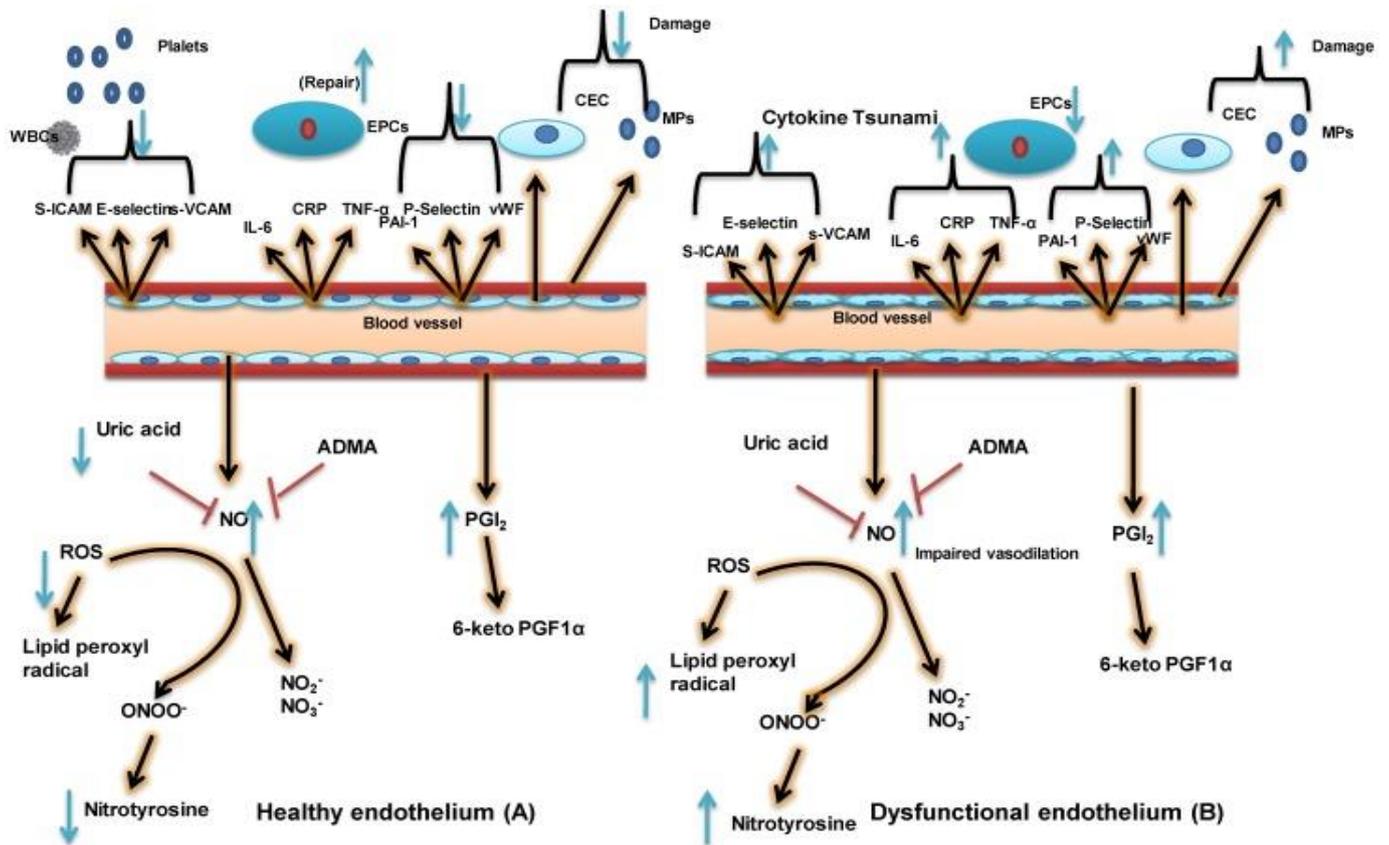


Figura 4. Diferencias entre un endotelio sano y uno disfuncional. Tomada de Rajendran P *et al*, 2013

las células y se agravan los problemas derivados de la disfunción. La aterosclerosis acaba formando una placa ateromatosa, formada por la acumulación de lípidos, que inducen inflamación, y células espumosas (derivadas de los monocitos reclutados) que agravan el problema. Las células endoteliales entran en senescencia y, finalmente, la placa en crecimiento acaba tapando la luz del vaso, se parte creando un trombo o incluso deriva en rotura del endotelio e inicia la cascada de coagulación, provocando un infarto¹².

Por otra parte, una angiogénesis excesiva es también fuente de multitud de problemas. Las causas tras este crecimiento también son variadas:

Diabetes

La diabetes es también causa de una angiogénesis excesiva en tejidos específicos, como en la retina, (retinopatía diabética).

Alteraciones durante el embarazo y en el desarrollo fetal

Muchos de los procesos patológicos relacionados con la angiogénesis tienen lugar durante el desarrollo fetal, donde la formación del sistema vascular es de importancia capital. Si durante este proceso se produce un desbalance de los gradientes que regulan la formación de órganos pueden derivar en serios problemas para el feto. Del mismo modo, alteraciones en la formación de la placenta, ocasionan importantes trastornos como la preeclampsia.

Inflamación crónica

La angiogénesis también tiene lugar en procesos de inflamación continuados en el tiempo. En el caso de

infecciones crónicas o procesos autoinmunes puede ocurrir que la acumulación de factores proinflamatorios derive en diversas patologías de esta índole, como sería por ejemplo la artritis reumatoide.

Cáncer

La mayor causa del exceso de crecimiento vascular es el crecimiento tumoral. Dado que los tumores crecen de forma descontrolada su núcleo rápidamente se queda sin nutrientes para mantener su crecimiento. Este hecho provoca que sólo aquellos casos donde se produzca una comunicación entre la vasculatura y el tumor para inducir una angiogénesis forzada que lo irrigue deriven en un tumor de crecimiento rápido, siendo por tanto los casos que reportan mayor gravedad.

El endotelio que irriga los tumores tiende además a perder parte de su selectividad como barrera, facilitando la transición epitelio-mesenquimal, primer obstáculo a superar por el tumor para metastatizar. Ciertos tejidos son especialmente sensibles a procesos de angiogénesis patológica. Es el caso de la retina y el sistema nervioso central.

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL: BIOMARCADORES

Las alteraciones estructurales y/o funcionales del endotelio vascular están presentes mucho antes de que se identifiquen patologías, como la arteriosclerosis, la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia y la diabetes. Dada la aparición temprana de la disfunción endotelial en numerosas enfermedades, actualmente el estudio de

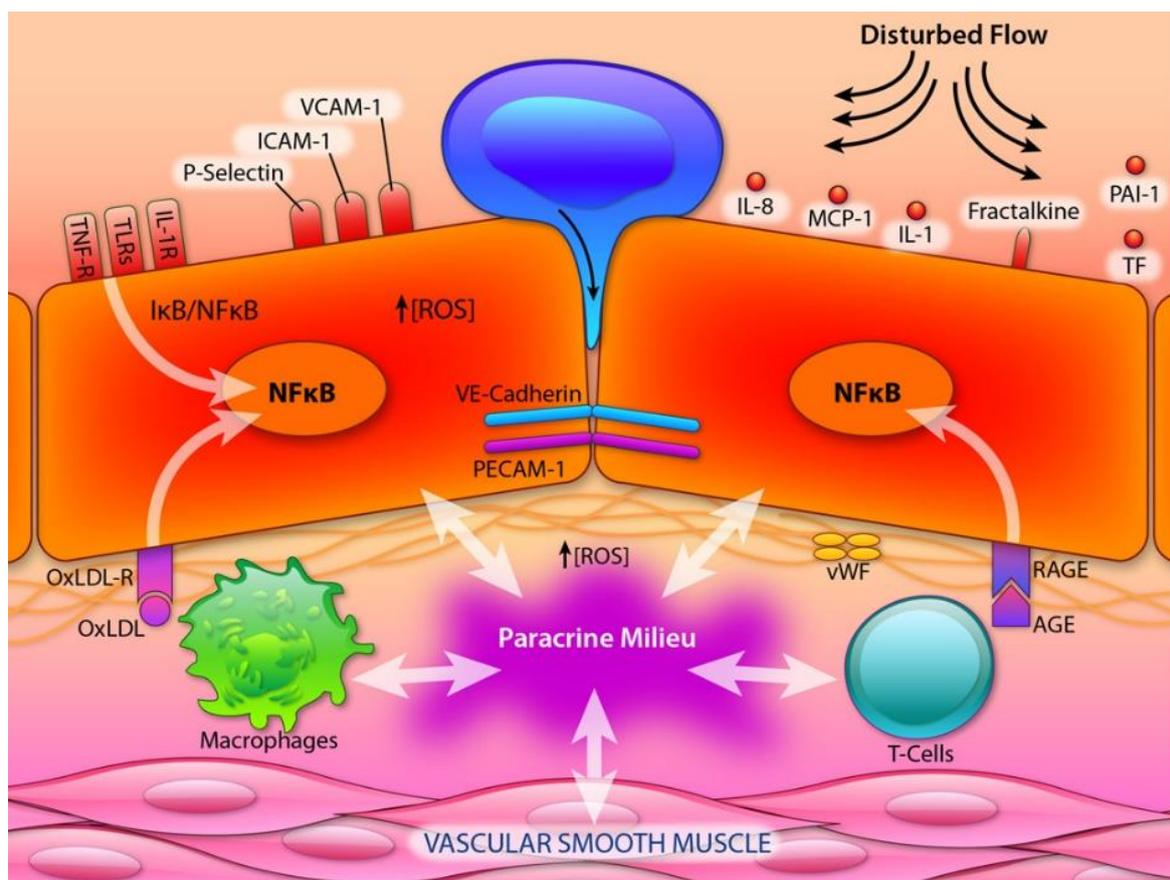


Figura 5. Biomarcadores daño endotelial. Tomada de Gimbrone MA *et al*, 2016

marcadores para su diagnóstico temprano es un campo de investigación en continua expansión.

Se pueden distinguir dos grupos de biomarcadores:

- **Biomarcadores bioquímicos**

Los marcadores clásicos de daño endotelial son E-selectina, PAI, las moléculas de adhesión como V-CAM, VEGF y el factor von Willebrand antigénico¹³. El VWF solo se sintetiza en el endotelio y los megacariocitos y está presente en los gránulos α de las plaquetas.

Los marcadores clásicos de daño o activación endotelial se han reportado incrementados en sepsis y shock séptico, arterosclerosis, enfermedad de injerto contra huésped aguda, pacientes de edad avanzada, pacientes con hiperhomocisteinemia, cáncer, enfermedad renal, y diabetes. Numerosos estudios señalan que el sistema angiopoyetina/TIE como un marcador de activación endotelial, ya que está restringido a la regulación de la célula endotelial y está involucrado en la señalización del fallo orgánico^{14,15}.

- **Biomarcadores celulares**

Otros marcadores de daño endotelial son las denominadas células endoteliales circulantes (CEC) y los progenitores endoteliales circulantes. El concepto de CEC incluye a las células progenitoras endoteliales (CPE) y a las células endoteliales descamadas de la pared de los vasos que entran a la circulación como resultado de la injuria vascular. El desbalance entre la expresión de células endoteliales circulantes (reflejando daño endotelial inflamatorio) y células

progenitoras endoteliales, que reflejan la capacidad de reparación endotelial, contribuiría a la patogénesis y progresión de varias patologías. Las CEP expresan el inmunofenotipo: CD133+, CD146+, VEGFR-2+, CD34+, CD45-, CD31+; mientras que las CEC presentan el perfil de expresión: CD31, CD144+, CD146+, CD133-, CD34-/+ y CD45-.

Las CPE se definen como aquellas células que no han concluido por completo su diferenciación a célula endotelial y conservan una alta capacidad proliferativa basal, aunque han transcurrido ya los pasos necesarios para que, de forma natural, no puedan retrotraerse al estado de célula madre pluripotente. Comparten por lo tanto muchas características comunes a las células endoteliales, pero a diferencia de aquellas no son adultas maduras ni capaces de cumplir sus funciones. Constituyen un indicador sensible y específico de lesiones y daños vasculares, para las que existen técnicas de detección¹⁶.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Márquez J, Sabán J, de la Torre N. El endotelio sano y enfermo. En: Sabán Ruiz J. Control global del riesgo cardiometabólico I: La disfunción endotelial como diana preferencial Bases fisiopatológicas, clínicas y diagnósticas de los factores de riesgo cardiovascular. Patogenia de las lesiones de los órganos diana. Madrid (España): Ediciones Díaz de Santos, SA; 2009. p. 81-110.

2. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res.* 2007; 100:174–90.
3. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007; 100:158–73.
4. Yao VJ, Ozawa MG, Trepel M, Arap W, McDonald DM, Pasqualini R. Targeting pancreatic islets with phage display assisted by laser pressure catapult microdissection. *Am J Pathol.* 2005;166:625–36.
5. Ushiyama A, Kataoka H, Iijima T. Glycocalyx and its involvement in clinical pathophysiologicals. *J Intens Care.* 2016;4:59
6. Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: Acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res.* 2010;87:300–10.
7. Tesauro M, Cardillo C. Obesity, blood vessels and metabolic syndrome. *Acta Physiol (Oxf).* 2011; 203:279–86.
8. Cines D, Pollak E, Buck C, Loscalzo J, Zimmerman G, McEver R, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998;91(10):3527-61.
9. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1057-69.
10. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011; 473:298–307
11. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):4411.
12. Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):620-36.
13. Lip GY, Foster W, Blann AD: Plasma von Willebrand factor levels and surrogates of atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3:659-661.
14. Siner JM. A tale of two ligands: angiopoietins, the endothelium, and outcomes. *Crit Care.* 2013;17(5):1007.
15. Page AV, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence.* 2013;4(6):507-516.
16. Erdbruegger U, Dhaygude A, Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells: markers and mediators of vascular damage. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2010 Dec;5(4):294-302.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Arranz CT, Elesgaray R, Costa MA. El endotelio vascular. En: Peral de Bruno M, Gómez Llambi H, Arranz C, Balazuc A. Hipertension Arterial, Epidemiología, Fisiología, Fisiopatología, Diagnóstico y Tratamiento. Buenos Aires (Argentina): SAHA; 2013. Disponible en: <http://www.saha.org.ar/pdf/libro/Cap.035.pdf>

CORTEZA SUPRARRENAL

Autores: Maialen Palomino Alonso, Mercedes Aramendi Ramos

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Cortisol, Andrógenos, ACTH

INTRODUCCIÓN

• Fisiología

Las glándulas suprarrenales son dos estructuras piramidales que se apoyan sobre los polos superiores de los riñones. Su nombre se debe a la localización topográfica, pero funcionalmente no están relacionados.

Reciben el suministro sanguíneo a través de las arterias suprarrenales (superior, media e inferior) y están inervadas por el sistema nervioso autónomo.

Cada glándula se compone de dos zonas: corteza y médula que además son embriológicamente distintas. La corteza deriva del mesodermo, se forma en la 4ª-6ª semana de la vida embrionaria y es productora de hormonas esteroidea. La médula en su interior procede del ectodermo y secreta catecolaminas. En la corteza, que supone el 80-90% de la glándula, se pueden diferenciar tres áreas morfofuncionales:

Zona glomerulosa

La capa más externa o zona glomerulosa comprende el 15% de la corteza y es productora de mineralocorticoides (aldosterona). Sus funciones son:

- Regulación del equilibrio electrolítico: induce reabsorción del Na⁺ y salida del K⁺.
- Regulación del líquido extracelular.
- Mantenimiento de la presión sanguínea.

Zona fascicular

La capa media o zona fascicular, que es la más amplia (3/4 partes de la corteza), secreta glucocorticoides (cortisol) encargados de:

- Aumentar el nivel de glucemia (hiperglucemiante). Estimulando la gluconeogénesis, disminuyendo el uso periférico de glucosa (salvo en el cerebro y corazón). Además, promueve la síntesis de glucógeno (glucogenogénesis).
- Estimular la proteólisis e inhibir la captación de aminoácidos y con ello la síntesis de proteínas.
- Estimular la lipólisis e incrementar recirculación de ácidos grasos.
- Actuación sobre el sistema inmune: con propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras.
- Disminuir la absorción de calcio y promover su excreción por el riñón.

Zona reticular

La capa más interna en contacto con la médula o zona reticular (10% de la corteza), secreta andrógenos, sobre todo dehidroepiandrosterona y su sulfato (DHEA y DHEA-S), y cantidades mínimas de androstenediona, 11-hidroxiandrostenediona y testosterona. Regulan los caracteres sexuales secundarios. Su producción es más relevante en mujeres ya que puede tener trascendencia

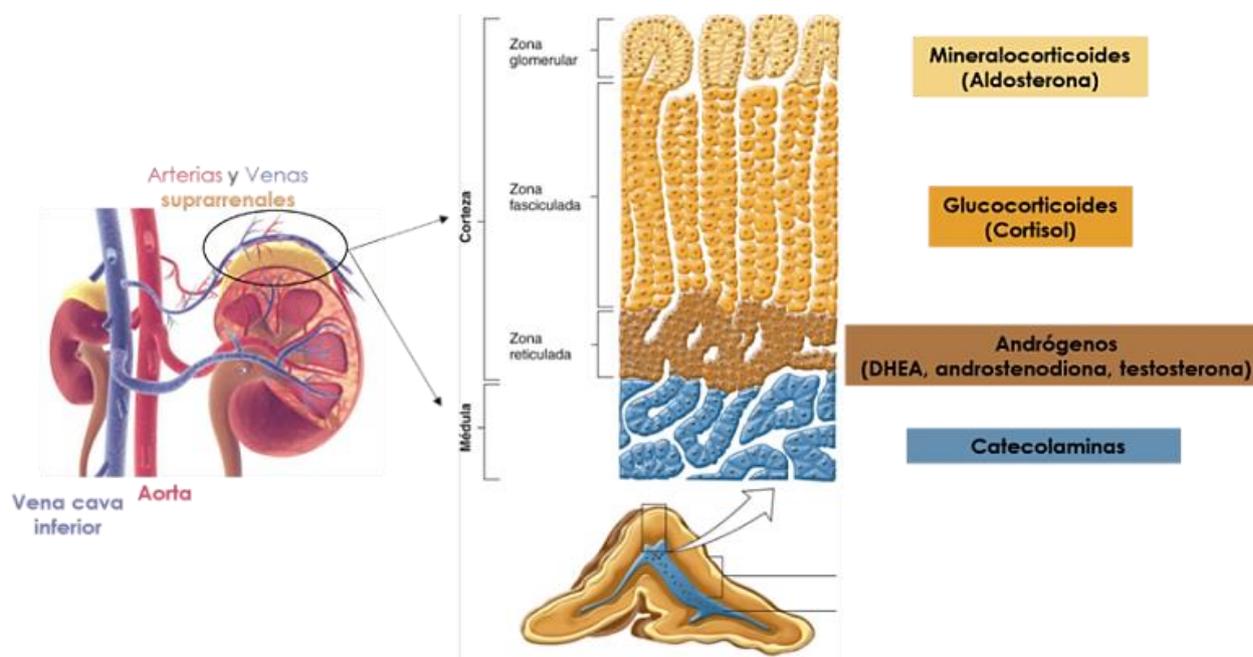


Figura 1. Fisiología de la glándula suprarrenal. Adaptado de: Molina PE, 2013.

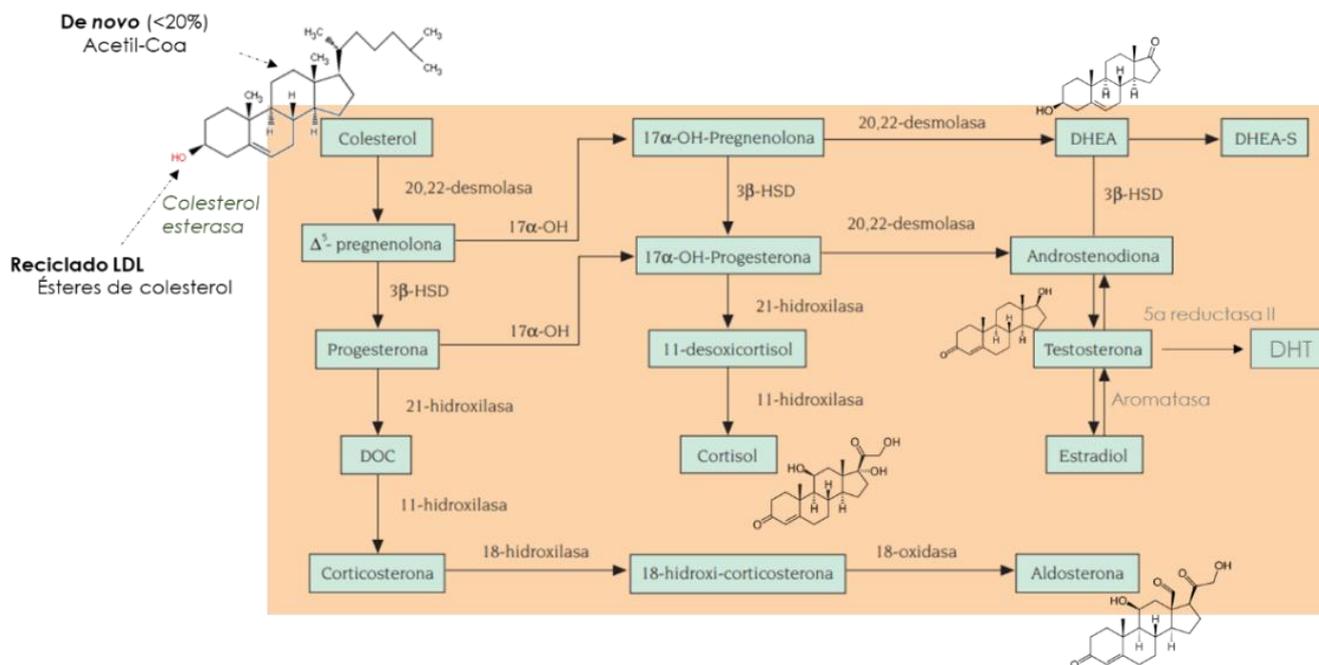


Figura 2. Vías de síntesis de los esteroides suprarrenales. Adaptado de Gonzalez-Albarrán O. *et al*, 2000.

clínica, sin embargo, en los hombres los efectos son mínimos ya que la producción mayoritaria es gonadal.

Los tres tipos hormonales son de naturaleza esteroidea, derivan del colesterol y la estructura básica es un núcleo de 4 anillos y 17 átomos de carbono denominado ciclopentanoperhidrofenantreno. Los derivados con 18 átomos de carbono se denominan estranos, los de 19 androstanos y los de 21 pregnanos. Tanto glucocorticoides como mineralocorticoides presentan 21 átomos de carbono y son los secretados en mayor cantidad. Los andrógenos presentan 19 átomos de carbono.

• **Síntesis de los esteroides suprarrenales**

Los esteroides suprarrenales se sintetizan a partir del colesterol, el cual proviene sobre todo del captado de lipoproteínas de baja densidad (LDL, *low density lipoprotein*) y en menor medida de la síntesis *de novo* a partir del Acetil-CoA (< 20%).

La razón por la cual el captado de LDL circulantes es la principal fuente de colesterol para la síntesis de los esteroides suprarrenales es porque la corteza adrenal posee numerosos receptores de estas lipoproteínas, pudiendo captar y almacenar colesterol en forma de ésteres. Para su uso previamente debe ser hidrolizado por la colesterol esterasa, liberando el colesterol.

Independientemente de su origen, el colesterol libre se transporta a la membrana mitocondrial interna, donde se transforma en pregnenolona. A partir de ahí, las vías de síntesis de cada esteroide se encuentran distribuidas por las tres zonas antes descritas, según la expresión de determinados genes que codifican las enzimas específicas para cada tipo de hormona. La mayoría de las enzimas involucradas son pertenecientes a la familia de las proteínas citocromicas P450 (hidroxilasas), pero también participan desmolasa, isomerasas y deshidrogenasas.

	CBG	SHBG	Albúmina	Libre
Aldosterona	20%	-	40%	40%
Cortisol	90%	-	7%	<5%
DHEA y DHEAS	-	3%	90%	
Testosterona	-	49-65% hombres 66-78% mujeres	33-50% hombres 20-30% mujeres	1%

Tabla 1. Transporte de las hormonas esteroideas tanto unidas a proteínas y como las fracciones libres. CBG, *Corticosteroid Binding Globulin*; SHBG, *Sex Hormone Binding Globulin*. Elaboración propia.

• Transporte

Las hormonas esteroideas suprarrenales, no se almacenan en glándulas, sino que se liberan a sangre tras su síntesis. Debido a su naturaleza lipídica, son insolubles en agua y tienen que ser transportadas unidas a proteínas (actúan de reservorio, transporte y distribución). Dentro de las proteínas transportadoras cabe destacar:

- Globulina enlazante de cortisol o transcortina (CBG, *corticoesteroid binding globulin*) por su elevada afinidad, aunque presenta baja capacidad de unión al cortisol. Se encarga del transporte de cortisol y aldosterona.
- Globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG, *Sex Hormone Binding Globulin*): presenta elevada afinidad, pero baja capacidad de transporte de andrógenos.
- Albúmina, con gran capacidad de almacenaje y presenta alta concentración sanguínea. Transporta los tres tipos hormonales, aunque con baja afinidad.

Hay un pequeño porcentaje de los esteroides suprarrenales que circulan libres en plasma, siendo la forma fisiológicamente activa (y la que se puede determinar en saliva y en orina, ya que se filtra y elimina por el riñón).

• Metabolismo

El metabolismo de los esteroides suprarrenales se realiza principalmente a nivel del hígado, aunque también participa el riñón y el aparato gastrointestinal.

Al hablar de metabolismo se incluyen las reacciones de oxidación, hidroxilación, reducción, fragmentación de cadena lateral, conjugación con ácido glucurónico o sulfatación. El objetivo de dichas reacciones es neutralizar la actividad biológica, los esteroides entonces se vuelven más polares y se pueden eliminar rápidamente por la orina. Los metabolitos conjugados con ácido glucurónico o sulfatados son las principales formas que se encuentran en la orina (de ahí que para su determinación se requieran tratamientos hidrolizantes con glucuronidasa) y tan solo 1% se secreta de forma libre.

En ocasiones el metabolismo de las hormonas produce compuestos con mayor actividad biológica, como ocurre en el caso de la DHEA y su sulfato. Éstos son los principales andrógenos suprarrenales, pero tienen una actividad débil, y una vez metabolizados periféricamente hasta testosterona adquiere una elevada actividad androgénica.

CORTISOL

El cortisol es el glucocorticoide más importante secretado por la corteza suprarrenal en la zona fasciculada. Su secreción sigue un ritmo circadiano y está marcada por el eje hipotálamo – hipófisis – corteza suprarrenal.

• Regulación de la secreción de cortisol

El hipotálamo secreta corticoliberina u hormona liberadora de corticotropina (CRH, *corticotropin-releasing hormone*), llega a la hipófisis anterior por el sistema portal hipotálamo

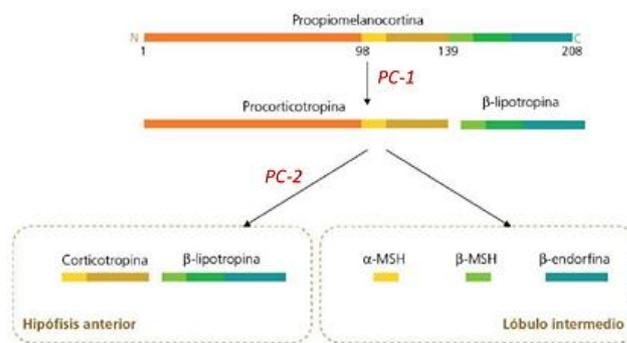


Figura 3. Procesamiento de la Proopiomelanocortina (POMC), glucoproteína de 241 aminoácidos y precursora, entre otras, de la Corticotropina o ACTH a través de la acción de las convertasas PC1 y PC2. Adaptado de: González Hernández, A. 2019.

hipofisiario y estimula la secreción de corticotropina u hormona adrenocorticotropa (ACTH, *adrenocorticotropic hormone*). Por circulación sanguínea llega a la corteza suprarrenal para estimular la síntesis y secreción de cortisol (también de andrógenos). El cortisol secretado, por retroalimentación negativa inhibe la secreción de CRH y ACTH.

La ACTH es una hormona peptídica hipofisiaria de 39 aminoácidos que regula la síntesis y secreción de cortisol. Se genera del procesamiento de una glucoproteína de 241 aminoácidos, la proopiomelanocortina (POMC) por acción de las convertasas PC-1 y PC-2 (Figura 3). La hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH), procede también de la POMC y además presenta una similitud estructural con la ACTH. Esto es relevante en cuanto a la clínica que manifiestan algunos pacientes, como se verá posteriormente. Otros fragmentos son la β lipotropina y la β endorfina.

La secreción de CRH, ACTH y cortisol sigue un ritmo circadiano en condiciones normales de sueño y vigilia. Las concentraciones máximas las encontramos entre las 6-8h, y van disminuyendo hasta ser mínimas a las 20h y durante la noche.

Sin embargo, hay diversos factores que alteran este ritmo. Al cortisol se le conoce como la hormona del estrés ya que se libera en este tipo de situaciones. Otros estímulos fisiológicos y emocionales que estimulan su síntesis son:

- Estados emocionales como depresión o ansiedad
- La propia retroalimentación hormonal
- Fiebre (IL-1)
- Traumatismos
- Hipoglucemia o desnutrición
- Ingestión de alcohol

• Patología relacionada con el cortisol

Síndrome de Cushing o hipercortisolismo

El término síndrome de Cushing indica un cuadro clínico generado por un exceso de cortisol de cualquier etiología, mientras que la enfermedad de Cushing se refiere a una

hiperfunción de la corteza suprarrenal estimulada por un exceso de ACTH hipofisaria.

Las causas que originan hipercortisolismo se pueden desglosar en:

1. Aumento de la síntesis de cortisol en la propia glándula suprarrenal (“ACTH independiente”)

Debido a diversas causas:

- Adenoma/carcinoma suprarrenal
- Displasia micronodular
- Hiperplasia macronodular
- Causa iatrogénica debido a la administración prolongada de corticotropina o glucocorticoides (dexametasona, prednisolona, prednisona o hidrocortisona) utilizados en el tratamiento de alergias, inflamaciones, asma o enfermedades gastrointestinales.

2. Aumento o síntesis inapropiada de ACTH (“ACTH dependiente”)

Causado por tumores en distintas localizaciones:

- Tumores hipofisarios (macro o microadenomas). Es lo denominado con tal enfermedad de Cushing.
- Tumores productores de ACTH de manera ectópica (pulmón, páncreas o neuroendocrinos).

Los pacientes afectos muestran unos rasgos característicos, como son:

- Obesidad central con abdomen protuberante y extremidades delgadas
- Rostro en forma de luna llena
- Hipertensión e hiperglucemia, donde el exceso de cortisol puede producir intolerancia a la glucosa e incluso diabetes
- Mayor tendencia a infecciones y a la mala curación de heridas
- Otros: estrías en piel de color púrpura, pérdida de masa muscular, osteoporosis y alteraciones psiquiátricas
- La elevación de forma crónica de ACTH produce hiperpigmentación de la piel. Se debe a que presenta una similitud estructural con la α -MSH, en la que comparten los primeros 13 aminoácidos,

que hace que la ACTH sea capaz de estimular también la síntesis de melanina.

- Hirsutismo, acné y alteraciones menstruales en mujeres generado por el exceso de andrógenos
- Edema por exceso de mineralocorticoides

Hay una condición clínica denominada Pseudo-Cushing desarrollada por alcoholismo crónico, obesidad, embarazo, estrés, depresión o anorexia. Presentan una clínica similar al Cushing, pero en la que la concentración de cortisol vuelve a la normalidad tras la resolución de la causa.

Hipocortisolismo

Las causas del hipocortisolismo también se pueden dividir en dos ramas:

1. Insuficiencia Suprarrenal Primaria

La afectación es a nivel de la glándula suprarrenal. Es lo que se conoce como enfermedad de Addison y se genera por:

- Destrucción anatómica de la glándula (aguda o crónica) debido a enfermedades autoinmunes, hemorragias, infecciones (tuberculosis, SIDA, micosis), traumatismos, suprarrenalectomias, enfermedades infiltrativas, invasiones metastásicas, etc.
- Fármacos inhibidores de síntesis esteroidea, como metopirona o bloqueantes del receptor de glucocorticoides RU-486.
- Errores metabólicos de la síntesis suprarrenal
 - Hiperplasia suprarrenal congénita
 - Adrenoleucodistrofia
 - Síndrome de Zellweger
 - Enfermedad de Wolman
 - Mutaciones del factor esteroideogénico-1 (SF-1)
 - Síndrome de Smith-Lemli-Opitz
 - Formas mitocondriales de enfermedad de Addison
 - Deficiencia familiar en glucocorticoides

2. Insuficiencia Suprarrenal Secundaria/Terciaria

Con afectaciones a nivel de hipófisis/hipotálamo:

- Tumores hipofisarios o hipotalámicos
- Traumatismo, irradiación, infección, hemorragia cerebral
- Inhibición del eje hipotálamo-hipofisario, tanto por administración de corticoides exógenos (suspensión brusca), como por producción endógenas de corticoides por un tumor

Los pacientes con déficit de cortisol muestran una serie de síntomas y signos, entre los que encontramos

- Debilidad, anorexia, náuseas y vómitos que llevan a la pérdida de peso
- Alteraciones de la percepción y de la conducta

Hipercortisolismo		Hipocortisolismo	
Primario	Secundario	Primario (Enfermedad de Addison)	Secundario
↓	↑ o N	↑	↓

Tabla 2. Diagnóstico etiológico diferencial de los estados de hiper/hiposecreción de cortisol según la concentración de ACTH en sangre. Elaboración propia.

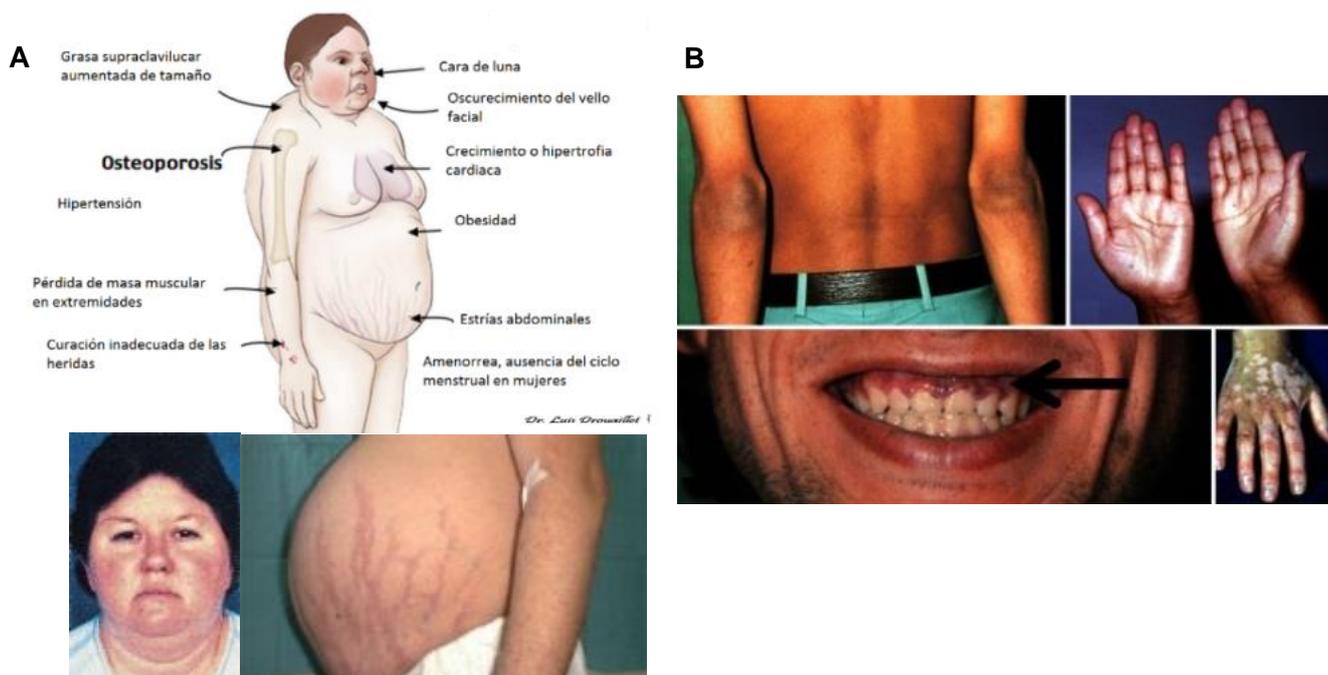


Figura 4. Características de pacientes con hipercortisolismo o síndrome de Cushing (A) y de hipocortisolismo o insuficiencia suprarrenal (B). Síndrome de Cushing [Internet]. Disponible en: <https://medium.com>; Enfermedad de Addison [Internet]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com>

- Como la insuficiencia adrenal genera también déficit de DHEA, hay una deficiencia de andrógenos en la mujer, sobre todo, ya que en los hombres es mantenida por la producción gonadal. Esto implica ausencia de pubarquia en niños (la adrenaquia precede a la gonadarquia), pérdida de pelo axilar y púbico en mujeres, piel seca y pérdida de libido.
- En la enfermedad de Addison (afectación suprarrenal) se genera, además: Deshidratación (hipovolemia), hipotensión, hiponatremia, hiperpotasemia y acidosis metabólica por la deficiencia también de aldosterona, con alta concentración de sodio urinario.
- Muchas veces hay un incremento secundario de ACTH que produce hiperpigmentación de la piel, por la similitud estructural con la α -MSH antes descrita.

• Estudio bioquímico

Se hace referencia al análisis de laboratorio utilizando diferentes tipos de muestras con distintos objetivos. Las determinaciones hormonales se realizan generalmente mediante técnicas de inmunoensayo no isotópicas e isotópicas (menos utilizadas en la actualidad) que pueden ser competitivas o no competitivas (inmunométrico, sándwich).

1. Sangre (suero/plasma)

Para la determinación de:

- Cortisol total, tanto el unido a proteínas como el pequeño porcentaje libre. Es importante que el paciente se encuentre en un ayuno de mínimo 12 horas, además de evitar el estrés. Debido al ritmo circadiano que presenta, la extracción debe ser anterior a las 9 de la mañana.

- ACTH. Esta hormona hipofisiaria es muy inestable en sangre y tiene elevada adherencia a los tubos de extracción (queda adsorbida al vidrio). Por esta razón, se determina en plasma utilizando tubos EDTA-K2 fríos, y depositados en hielo tras la extracción de la muestra para ser centrifugados a 4°C. Además, como ocurre en el caso del cortisol, es necesario un ayuno de 12 horas, evitar el estrés y una extracción antes de las 9 de la mañana.

La utilidad clínica es para el diagnóstico etiológico diferencial de los estados de hiper e hiposecreción de cortisol (tabla 2), además de para el estudio del eje hipofisario-hipotálamo-corticosuprarrenal mediante pruebas basales y funcionales.

2. Saliva

Se encuentra en equilibrio con la fracción de cortisol libre plasmático.

Es un método cómodo por no ser ni invasivo ni estresante para el paciente al evitar la punción y el ingreso. La toma de la muestra se puede realizar en el domicilio y debe ser a última hora del día, se recomienda espaciar un par de horas de la ingestión de alimentos, tampoco se debe beber ni lavar los dientes media hora antes. Consiste en extraer la torunda del tubo para recogida de muestra en saliva y masticar suavemente durante aproximadamente 2 minutos para empaparla con saliva. Se vuelve a colocar la torunda en tubo y se almacena a temperatura ambiente durante la noche para mandarla al día siguiente al laboratorio.

3. Orina de 24 horas

Útil para estimar la fracción libre de cortisol, que además está libre de la variabilidad causada por el ritmo circadiano. Es importante una correcta recolección de la muestra anotando la diuresis, además de descartar alteraciones en

	Valores referencia	
	8-10h	16-20h
Cortisol sangre (total)	6 – 18 µg/dL	3 – 10 µg/dL
Cortisol saliva (libre)	<0,783 µg/dL	<0,243 µg/dL
Cortisol orina (libre)	13 – 75 µg/24h	
ACTH sangre	4,70 – 48,8 pg/mL	-

Tabla 3. Valores de referencia (utilizados en el H.U. 12 de Octubre) del cortisol en suero, saliva y orina y de ACTH. Importante la variación en los valores de la concentración de cortisol a primera y última hora del día debido al ritmo circadiano. Elaboración propia.

la función renal y tratamiento con corticoides que puedan falsear resultados

Aunque los valores de referencia se deben ajustar en cada laboratorio, a modo orientativo los rangos de referencia que oscilan las distintas determinaciones son los mostrados en la Tabla 3.

• Pruebas funcionales

Las pruebas dinámicas o funcionales se basan en la estimulación o inhibición de una hormona para conocer su capacidad de reserva o su estado de regulación.

Test de supresión de Nugent

Utilizado para la evaluación de la hipersecreción suprarrenal de cortisol. Consiste en la administración de 1mg de dexametasona oral nocturna (sobre las 23h) junto con una extracción de sangre a las 8 de la mañana.

La dexametasona es un glucocorticoide sintético más potente que el cortisol que inhibe secreción ACTH y por tanto de cortisol. Por ello, en individuos sanos se va a producir una disminución en la concentración cortisol, pero en casos de síndrome de Cushing no se produce inhibición y las concentraciones se mantienen elevadas.

Se considera supresión adecuada una concentración de cortisol post-dexametasona inferior a 1,8 µg/dL.

Test de estimulación de Thorn (Synacthen®)

Se utiliza para estudiar la capacidad de las glándulas suprarrenales de sintetizar cortisol. Consiste en la administración de 250 µg de tetracosactín intravenoso (Synacthen®), una molécula de ACTH sintética que contiene la secuencia N-terminal de 24 aminoácidos (la que tiene la actividad estimulante sobre la corteza).

Es necesaria una medición del cortisol sanguíneo basal previa a su administración junto con otra medición post ACTH a los 30 (opcional) y 60 min. Una respuesta adecuada al estímulo sería una concentración de cortisol mayor a 18 µg/dL y/o un incremento mayor o igual a 9 µg/dL respecto al

basal (siempre que el cortisol basal sea mayor o igual a 5 µg/dL).

Existen otras pruebas que ayudan a establecer la etiología del Cushing como son la frenación a dosis altas de dexametasona, el test de CRH y el cateterismo de senos petrosos.

ANDRÓGENOS SUPRARRENALES

Los principales andrógenos sintetizados por la corteza suprarrenal son DHEA y su sulfato (DHEA-S). Además, hay una producción, aunque menor, de androstenediona y testosterona.

Mientras que en el hombre la producción suprarrenal de andrógenos tiene poca importancia en comparación con la síntesis testicular, en la mujer si tiene un papel relevante.

• Regulación

Su síntesis y secreción se regula mediante el eje hipotálamo (CRH) – hipófisis (ACTH) – corteza suprarrenal (zona reticular).

• Patología relacionada

Hirsutismo

Es la presencia de pelo terminal en la mujer distribuido en localizaciones típicas masculinas. El folículo piloso produce tanto vello (fino, suave, no pigmentado) como pelo terminal (largo, áspero, pigmentado, limitado a determinadas zonas y que depende de factores genéticos y hormonales). La distribución del pelo terminal es un carácter poligénico que influye en número total y sensibilidad de receptores androgénicos en el folículo.

Los andrógenos son reguladores clave en conversión de vello en pelo terminal. La dihidrotestosterona (DHT) se origina a partir de la testosterona libre por acción de la 5α reductasa II. Es el principal efector androgénico sobre el folículo piloso, ya que presenta mayor afinidad por los receptores androgénicos así como una disociación más lenta de éstos que la testosterona.

El crecimiento del pelo en cara, pecho, zona superior abdomen y espalda necesita niveles altos de andrógenos y por eso suele ser la manifestación clínica que observamos en casos de hirsutismo.

Las causas de hirsutismo son varias, encontrándose asociado a diferentes condiciones clínicas:

- Síndrome de Cushing
- Hiperplasia suprarrenal congénita
- Adenomas o carcinomas virilizantes
- Hiperandrogenismo suprarrenal funcional
- Acción y metabolismo anormal del cortisol
- Adrenarquia prematura
- Otras: cuando el origen de los andrógenos es ovárico, formas idiopáticas, acromegalia o por causa medicamentosa

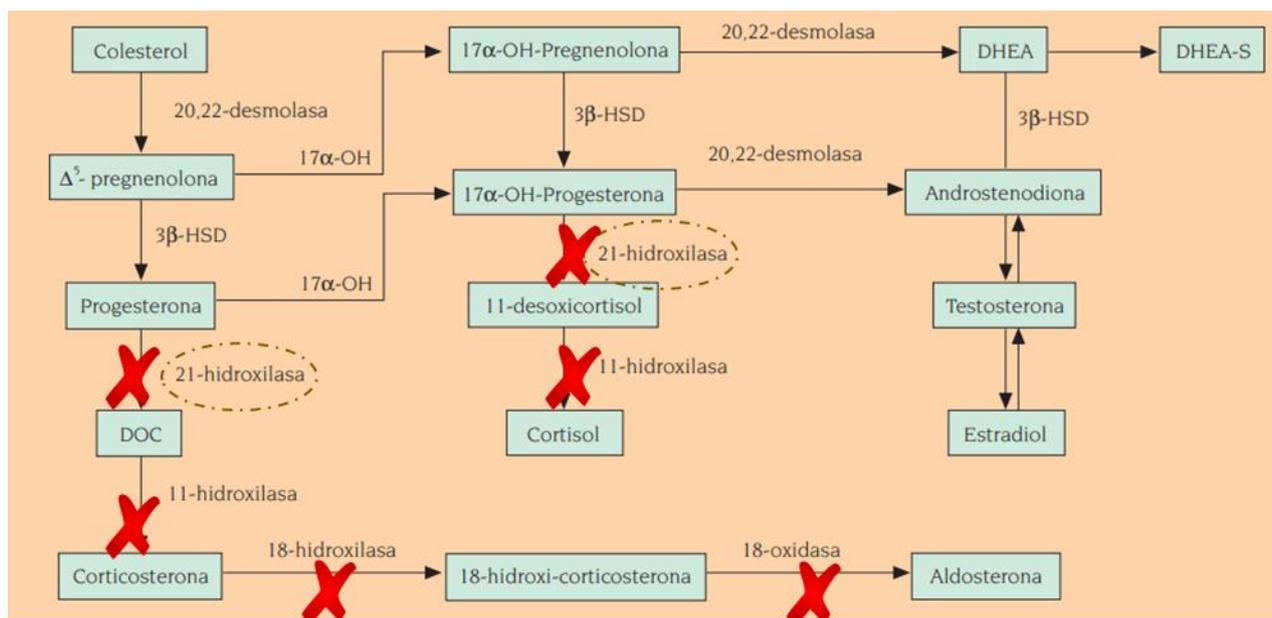


Figura 5. Vías inhibidas debido al déficit de la enzima 21-hidroxilasa. Adaptado de González-Albarrán O. et al, 2000.

Déficit 21 hidroxilasa (CYP21B)

Es la forma clínica más frecuente (92%) de hiperplasia suprarrenal congénita. Se debe a una mutación o deleción del gen que codifica la enzima microsómica citocromo P450 21-hidroxilasa, generando una enzima inactiva. Presenta una herencia autosómica recesiva.

Esta enzima cataliza el paso de progesterona a 11-desoxicorticosterona y de 17-hidroxiprogesterona a 11-desoxicortisol. Esto hace que aumenten los niveles de 17-hidroxiprogesterona, que acaba derivando la ruta hacia la síntesis de andrógenos (figura 2).

Se pueden encontrar varias formas de presentación clínica:

- Forma clásica con gran deficiencia enzimática al sufrir una grave alteración de ambos alelos. Se detecta en recién nacido, en etapas tempranas de la vida, con 2 variantes: virilizante y pierdesal.
- Forma no clásica (infancia y adulto) con una actividad residual de la enzima por la alteración moderada de ambos alelos (o grave en una y moderada en el otro).

Como características cabe destacar en la forma clásica una insuficiencia suprarrenal y el hiperandrogenismo. Hay un déficit de cortisol y de aldosterona (pierde sal), además de exceso de andrógenos y sus metabolitos. En las formas menos graves la instauración es más lenta sobre todo si no existe pérdida de sal.

Como síntomas y signos que aparecen en la forma no clásica:

- En mujeres durante la infancia: pubarquia prematura, piel grasa con acné, aceleración del crecimiento y maduración ósea y moderada hipertrofia del clítoris.

- En mujeres durante adolescencia y edad adulta: trastornos del ciclo menstrual, ovario poliquístico, infertilidad o acné, aunque la manifestación más frecuente es el hirsutismo.
- Los hombres suelen ser asintomáticos.
- No se acompaña de déficit de aldosterona y el déficit de cortisol es compensado por el incremento de ACTH por lo que no suele tener clínica apreciable.

• Prueba funcional de estimulación (Synacthen®)

Se trata de la misma prueba funcional que la descrita para el estudio de hipocortisolismo, que en este caso se utiliza para la sospecha de déficit del enzima 21 hidroxilasa. Tras un estímulo agudo con ACTH sintética, como hay déficit de la enzima catalizadora de la síntesis de cortisol no se estimula su producción, por lo que se genera una acumulación de los precursores. En la prueba funcional se mide el precursor 17-hidroxiprogesterona basal y a los 60 minutos del estímulo, siendo su incremento notable (> 10 ng/mL) en esta patología.

BIBLIOGRAFIA ESPECIFICA

1. González-Albarrán O, Fraile J, García Robles R. Fisiología de las glándulas suprarrenales. Medicine. 2000;8(21):1097-1101.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Aniel Quiroga MA, Martínez de Osaba MJ, Berlanga E. Nuevas perspectivas en insuficiencia suprarrenal y síndrome de Cushing. Madrid: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2011.
- Esteban Salan M. Contribución de laboratorio a la valoración de la función cortico-suprarrenal.

- Programa de formación continuada a distancia.
Madrid: AEFA; 2009.
- Fernández Castro C, Rodelgo Jiménez L, Ruiz Ginés MA, Ruiz Martín G. El laboratorio clínico y la función hormonal. Labcam; 2011.
 - Fernández Rodríguez E. Enfermedad de Addison. Ed Cont Lab Clín. 2007; 10: 60-65.
 - González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular, 3ª ed. Barcelona: Elsevier España; 2019.
 - Gutiérrez Menéndez ML, Losada Cabrera JA. El papel del laboratorio en el diagnóstico etiológico del hirsutismo. Curso de formación continuada a distancia, AEBM; 2009.
 - López Lazareno N. Síndrome de Cushing: diagnóstico bioquímico. Ed Cont Lab Clín. 2009; 12: 51-60.
 - Martínez de Osaba Madariaga MJ, Castmitjana Abella R. El laboratorio en la función androgénica. Monografía. Roche Diagnostics; 2004.
 - Molina PE. Glándula suprarrenal. En: Raff H, Levitzky M, editores. Fisiología médica: Un enfoque por aparatos y sistemas. México D.F.: McGraw-Hill, 2013. [Internet]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1501§ionid=101809653>

MINERALOCORTICOIDES: ALDOSTERONA

Autores: Ylenia Pérez Arnaiz, Ilenia Liria González

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Aldosterona, Aldosteronismo, Mineralocorticoides

ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA SUPRARRENAL

Las glándulas adrenales o suprarrenales son estructuras bilaterales de unos 4 gramos localizadas sobre los riñones. Se dividen en dos zonas embriológicamente diferentes: la parte más interna llamada médula suprarrenal que ocupa en torno a un 10-20% de la glándula y produce catecolaminas, y la zona más externa o corteza suprarrenal que ocupa el 80-90% restante. Esta última, a su vez, está comprendida por tres capas morfológica y funcionalmente diferentes:

- Zona glomerular: parte más externa y sintetiza el mineralocorticoide aldosterona, así como la desoxicorticosterona y corticosterona que también poseen actividad mineralocorticoide.
- Zona fascicular: zona intermedia productora de glucocorticoides (cortisol).
- Zona reticular: zona más interna, en contacto con la médula que sintetiza andrógenos.

ALDOSTERONA

- Generalidades

La aldosterona fue identificada y descrita por primera vez en 1953 por SA Simpson. Se trata del principal esteroide de origen biológico con acción mineralocorticoide. Es la hormona encargada de la regulación del volumen extracelular y del balance de sodio y potasio a través de un incremento de la reabsorción de sodio y la secreción de potasio.

La aldosterona, al igual que el resto de las hormonas esteroideas, no se almacena, sino que es liberada al torrente sanguíneo según se sintetiza. Esta secreción es episódica (50-200 µg/día) y sigue un ritmo circadiano. Una vez en sangre, es transportada, en su mayor parte, unida a proteínas, concretamente un 40% se transporta unida a albúmina y un 20% unida a transcortina (proteína transportadora de corticosteroides que también tiene afinidad por la aldosterona); el 40% restante circula de forma libre siendo esta la forma activa de la hormona que será captada por los receptores de mineralocorticoides. Estos receptores solo se expresan en la porción distal de la nefrona, en la porción distal del colon y en las glándulas salivales y sudoríparas, siendo, por tanto, los únicos tejidos donde la aldosterona ejerce su acción induciendo la transcripción del canal apical del sodio (ENaC) y la bomba Na-K-ATPasa.

Por último, en cuanto a la metabolización de la hormona, esta tiene lugar a nivel hepático y se excreta en orina como derivado 3-glucoronido de la tetrahydroaldosterona.

- Síntesis

Las hormonas esteroideas son derivados del colesterol y se sintetizan en cantidades sistémicamente relevantes en

relativamente pocos tejidos (glándulas suprarrenales, gónadas, placenta y piel).

La síntesis de estas hormonas esteroideas comparte ruta en sus primeras etapas, siendo el paso limitante la captación de colesterol y su transporte hacia el interior de la membrana mitocondrial. Este colesterol precursor procede, fundamentalmente, del captado de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes y menos del 20% proviene de la síntesis de *novo* a partir de acetilCoA. Debido a ello, la corteza suprarrenal posee abundantes receptores de LDL, que le proporcionan una elevada capacidad de captar colesterol.

La ruta biosintética de la aldosterona comienza con la conversión del colesterol en pregnenolona y, tras una serie de reacciones encadenadas, gracias al complejo enzimático aldosterona sintasa o citocromo P450aldo (CYP11B2), la desoxicorticosterona se transforma en aldosterona en tres pasos consecutivos. El complejo enzimático catalizador de esta reacción únicamente se expresa en la zona glomerular de la glándula suprarrenal, siendo el único tejido donde se sintetiza aldosterona.

La producción de aldosterona está regulada principalmente por:

- Angiotensina II: gracias al sistema renina-angiotensina detallado a posteriori.
- Potasio: incrementa la síntesis de aldosterona por medio de dos mecanismos: aumentando la expresión de la proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR), encargada de estimular la captación de colesterol por las células aumentando, por tanto, la disponibilidad de sustrato para la síntesis de las hormonas esteroideas; y aumentando la transcripción de la enzima aldosterona sintasa.
- ACTH (hormona adrenocorticotropa): el efecto de esta hormona sobre la síntesis de aldosterona es menor y se da sobre todo en las vías iniciales de la esteroidogénesis suprarrenal, careciendo de efectos sobre la aldosterona sintasa.
- También influyen en la secreción de aldosterona, aunque en menor medida, la pro-opiomelanocortina (POMC) precursora de la hormona ACTH, que actúa activando la producción de aldosterona; la dopamina y el péptido natriurético atrial que actúan como inhibidores de la secreción de aldosterona.
 - Sistema renina-angiotensina

El sistema renina-angiotensina es el regulador por excelencia de la secreción de aldosterona (Figura 1). Las diferentes proteínas que conforman este sistema se encuentran en las glándulas suprarrenales, los riñones, el corazón y el cerebro.

La renina es una enzima producida por las células del aparato yuxtaglomerular del riñón, se almacena en gránulos secretores y se libera en respuesta a distintos factores: hiponatremia, hipoperfusión renal (hipovolemia debido a hemorragias, deshidratación), incremento de la actividad simpática ante cambios posturales en respuesta a la posición erguida e hipopotasemia. En cambio, la liberación de esta se ve disminuida ante una presión de perfusión elevada en el riñón (ej: hipertensión), una dieta con alto contenido en sodio, hiperpotasemia, por la propia angiotensina II y por el péptido natriurético auricular.

Esta enzima actúa sobre su único sustrato conocido, el angiotensinógeno, una α_2 -microglobulina sintetizada en el hígado, que se escinde a angiotensina I que, acto seguido, se convierte en angiotensina II, forma biológicamente activa, por acción de la enzima peptidil-peptidasa A o enzima convertidora de angiotensina (ECA), una enzima sintetizada a nivel pulmonar, endotelial y de la glándula suprarrenal. Una vez liberada al torrente sanguíneo, el tiempo de vida media de la angiotensina II es muy corto, menos de 60 segundos.

La angiotensina II tiene como función mantener el volumen extracelular y la presión arterial normales. Para ello incrementa la secreción de aldosterona en la glándula suprarrenal aumentando la actividad de la enzima citocromo P450_{scc} (CYP11A1), responsable de la síntesis de pregnenolona a partir de colesterol, y de la aldosterona sintasa. Además, la angiotensina II también posee acciones vasoconstrictoras provocando un aumento de la presión arterial y reduciendo el flujo sanguíneo renal; induce la liberación de noradrenalina y adrenalina en la médula suprarrenal y la liberación de vasopresina.

PATOLOGÍAS ASOCIADAS

En cuanto a las patologías asociadas, podemos dividir las en dos grandes grupos: hiperaldosteronismo e hipoaldosteronismo. Las primeras cursan con un aumento de la secreción de aldosterona de distinta etiología mientras que las segundas cursan con un déficit de esta hormona.

• **Hiperaldosteronismo**

1. **Hiperaldosteronismo primario**

Se define como hiperaldosteronismo primario al "grupo de trastornos con una producción inapropiadamente alta de aldosterona en los que la producción apenas depende de los factores reguladores principales de la secreción (angiotensina II y concentración plasmática de potasio) y no se suprime con una carga de sodio". Esta secreción es relativamente autónoma y en la mayoría de los casos tiene su origen en la corteza suprarrenal.

Actualmente se considera la principal causa de hipertensión arterial secundaria de origen endocrino.

La Sociedad de Endocrinología de EE.UU. ⁽¹⁾ recomienda la búsqueda de hiperaldosteronismo primario en pacientes que presenten:

- Hipertensión arterial grave (tensión arterial mayor de 150/100 mmHg en tres determinaciones realizadas en tres días distintos).
- Hipertensión arterial resistente a tratamiento (140/90 mmHg resistente a tres fármacos o hipertensión arterial controlada con 4 o más hipertensivos).
- Hipertensión arterial con hipopotasemia espontánea o inducida por diuréticos.
- Hipertensión arterial e incidentaloma adrenal.
- Hipertensión arterial y síndrome de apnea obstructiva del sueño (se considera que el exceso de aldosterona aumenta el edema en la nasofaringe debido a la retención de sodio y agua).
- Hipertensión arterial con antecedentes familiares de inicio temprano.
- Todos los pacientes con hipertensión arterial y antecedentes familiares de primer grado de hiperaldosteronismo.

Bioquímicamente, el sodio se encuentra en el límite alto de la normalidad debido a su retención renal. Además, puede

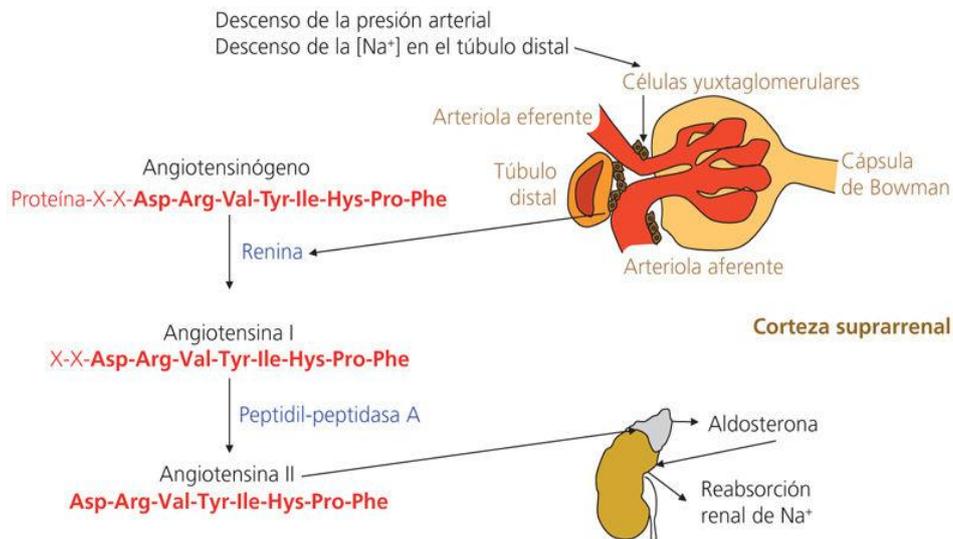


Figura 1. Sistema renina-angiotensina-aldosterona. Tomada de: González Hernández, 2019

cursar con hipopotasemia debido a un aumento del intercambio de Na^+/K^+ en el túbulo distal que conduce a una pérdida de potasio e hidrogeniones (hipopotasemia y alcalosis metabólica). La determinación de aldosterona y la concentración de renina (CDR), para el cálculo posterior del cociente aldosterona/CDR, son consideradas las pruebas de elección para el despistaje de hiperaldosteronismo primario.

En primer lugar, es importante tener en cuenta ciertas consideraciones preanalíticas como la retirada de fármacos antagonistas de la aldosterona, diuréticos ahorradores de potasio, IECA, ARA-II (aumentan los niveles de renina), β -bloqueantes y AINE (disminuyen los niveles de renina) durante al menos cuatro semanas y la realización de la extracción al menos dos horas tras despertar y tras permanecer sentado de 20 a 30 minutos. Sin embargo, si el paciente precisa tratamiento hipertensivo, se pueden emplear antihipertensivos no antagonistas de la aldosterona como los α -bloqueantes.

En cuanto al resultado del cociente se puede concluir que:

- Los cocientes aldosterona/CDR $>2,4$ son sugestivos de hiperaldosteronismo primario.
- Los cocientes aldosterona/CDR $>3,7$ son casi confirmatorios de hiperaldosteronismo primario, siempre que la aldosterona sea superior a 15 ng/dL. Esto es debido a que este ratio está muy influenciado por los valores bajos del denominador, por lo que los niveles de renina disminuidos, comunes en algunos grupos poblacionales como ancianos o pacientes con insuficiencia renal, pueden resultar en ratios falsamente elevados.

Una vez que se ha obtenido un cociente aldosterona/CDR anómalo, el paciente ha de someterse a una o más pruebas confirmatorias siendo estas diferentes pruebas funcionales cuyo objetivo es demostrar una producción autónoma de aldosterona (Tabla 1).

2. Hiperaldosteronismo secundario

- El hiperaldosteronismo secundario hace referencia al aumento de la concentración de aldosterona por la activación del sistema renina-angiotensina. Esto puede estar causado por:
 - Hiperplasia de las células yuxtaglomerulares provocando una elevación de las concentraciones de renina y aldosterona (hiperaldosteronismo hiperreninémico). Es lo que se conoce como síndrome de Bartter.
 - Tumores de células yuxtaglomerulares y otras neoplasias de riñón con producción autónoma de aldosterona.
 - Insuficiencia cardíaca congestiva. Al verse disminuida la perfusión renal, se estimula el sistema renina-angiotensina.

En muchos casos de hiperaldosteronismo primario no es necesario un tratamiento y en otros, cuando este hiperaldosteronismo está asociado a enfermedades cardíacas o hepáticas con hipernatremia e hipopotasemia es necesario el tratamiento con antagonistas de la aldosterona o IECAs.

3. Seudohiperaldosteronismo o síndrome de Liddle

Enfermedad autosómica dominante con presencia de mutaciones de ganancia de función en los genes codificantes del canal epitelial de sodio (ENaC) provocando un aumento de la reabsorción de sodio. Cursa con hipertensión arterial, hipopotasemia e hipernatremia, simulando hiperaldosteronismo, pero, en este caso, la secreción de aldosterona es mínima.

4. Exceso aparente de mineralocorticoides

Es debido a una actividad disminuida de la enzima 11- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 2 encargada de la conversión del cortisol (con actividad mineralocorticoide) en cortisona (carece de esta actividad mineralocorticoide). Al estar disminuida esta actividad, la concentración de cortisol se eleva y actúa sobre el receptor mineralocorticoide dando lugar a un hiperaldosteronismo funcional con concentraciones suprimidas de aldosterona y renina.

Existen formas familiares hereditarias que se tratan con antagonistas de receptores de aldosterona y formas adquiridas debidas al consumo de productos que contienen ácido glicirrínico y ácido glicirretínico (regaliz o tabaco de mascar) que inhiben al enzima competitivamente. Esta forma exógena es reversible y basta con cesar el consumo de estas sustancias.

- Hipoaldosteronismo

El término hipoaldosteronismo hace referencia a un grupo de trastornos que cursan con una producción inapropiadamente baja de aldosterona o resistencia a ella, dando lugar a hiperpotasemia, hiponatremia y acidosis metabólica.

1. Hipoaldosteronismo primario

- Hipoaldosteronismo primario congénito

Se trata de una enfermedad con herencia autosómica recesiva producida por una mutación en el gen *CYP11B2* que desemboca en un déficit de la enzima aldosterona sintasa dando lugar a una deficiencia aislada de la secreción de aldosterona. Cursa con concentraciones bajas de aldosterona y con una acumulación de 18-hidroxycorticosterona y sus metabolitos.

- Hipoaldosteronismo primario adquirido

El hipoaldosteronismo primario adquirido puede derivarse de la toma de diuréticos ahorradores de potasio por el cierre de canales de sodio en los túbulos o por ser antagonistas del receptor tubular de potasio. Además, la heparina y sus derivados pueden disminuir la biosíntesis de aldosterona con aumento compensatorio de renina y angiotensina II.

2. Hipoaldosteronismo asociado a hiperplasia suprarrenal congénita

La hiperplasia suprarrenal congénita agrupa a siete enfermedades autosómicas recesivas debidas a mutaciones en distintos genes que codifican enzimas implicadas en vías de la biosíntesis del cortisol. Más del 95% de los casos se debe a un déficit de 21-hidroxilasa manifestándose con una clínica virilizante debido a un déficit en la síntesis de glucocorticoides y mineralocorticoides y un exceso de andrógenos de origen suprarrenal como androstediona y dehidroepiandrosterona.

Prueba	Procedimiento	Resultado	Limitaciones
Infusión intravenosa de suero fisiológico	Administración de 2L de suero en 4 horas tras ayuno nocturno Determinación de aldosterona a las 4 horas	CN: aldosterona < 5 ng/dL Indeterminado: aldosterona entre 5-10 ng/dL Confirmatorio: aldosterona >10 ng/dL	Contraindicada: HTA grave, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, arritmias cardíacas e hipopotasemia
Sobrecarga oral de sodio	Ingesta mínima de 6g NaCl/día durante 3 días Recoger la orina del 3º al 4º día Determinación de aldosteronuria y natriuresis	Confirmatorio: aldosteronuria > 12-14 µg/24horas y natriuresis > 100 mEq/24 horas	Contraindicada: HTA severa no controlada, arritmia cardíaca e hipopotasemia severa En pacientes con insuficiencia renal puede coexistir HAP con valores bajos de aldosterona
Supresión con captopril	Administración de 25-50 mg de captopril oral Extracción de muestra basal y pasada 1 hora Determinación de CDR y aldosterona	CN: aldosterona plasmática suprimida > 30% Confirmatorio: aldosterona > 8,5-15 ng/dL ; CDR suprimida; aldosterona/CDR > 3,7	Se han detectado resultados equivocados y falsos negativos.
Supresión con fludrocortisona	Administración de 0,1 mg/6h de fludrocortisona durante 4 días ; KCl cada 6h para mantener normopotasemia; NaCl asegurando natriuresis de 3mmol/Kg/día Extracción para determinar ARP, aldosterona y K basales y al 4º día cortisol (7:00), cortisol y aldosterona (10:00)	Confirmatorio: aldosterona > 6 ng/dL ; ARP < 1 ng/mL/h ; normopotasemia ; cortisol 10:00 < cortisol 7:00	Régimen hospitalario

Tabla 1. Pruebas funcionales para diagnóstico de hiperaldosteronismo primario. Adaptado de: Funder *et al.* 2008

3. Seudohipoaldosteronismo

Síndrome debido a una resistencia a la acción de aldosterona al no existir respuesta a los mineralocorticoides debido a un déficit de receptores funcionales de mineralocorticoides.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, et al. The management of primary aldosteronism: case detection, diagnosis, and treatment: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(5):1889-1916.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- González Hernández A, Alegre Martínez E, Monreal Marquiegui I, Mugueta Uriaque C, Restituto Aranguibel P, Varo Cenarruzabeitia N. Hormonas esteroideas suprarrenales. En: González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 2ª ed. Barcelona: Elsevier, 2014. p. 243-252.
- Halperin Rabinovich I, Hanzu FA, Mora Porta M. Enfermedades de las glándulas suprarrenales. En: Domarus A, Farreras P, Rozman C, et al. Farreras Rozman. Medicina Interna. 18ª ed. Barcelona: Elsevier; 2016. p. 1981-2001.
- Klein I, Biondi B. Trastornos endocrinos y enfermedad cardiovascular. En: Zipes D, Libby P, Bonow R, Mann D, Tomaselli G, Braunwald E. Braunwald. Tratado de

- cardiología. 11ª ed. Barcelona: Elsevier; 2019. p. 1807-1821.
- Pearce D, Bhalla B, Funder JW. Aldosterona y receptores mineralocorticoides: papeles renales y extrarrenales. En: Brenner y Rector. El riñón. 10ª ed. Barcelona: Elsevier; 2018. p. 303-324.
 - Rodríguez Gómez IA, Bernabeu I, Guillín C, Casanueva F. Hiperaldosteronismo e hipoaldosteronismo. Medicine. 2016;12(14):787-794.
 - Stewart PM, Newell-Price J. Corteza suprarrenal. En: Melmed S, Polonsky K, Larsen P, Kronenberg H. Williams. Tratado de endocrinología. 13ª ed. Barcelona: Elsevier; 2017. p. 490-555
 - White B. La glándula suprarrenal. En: Koeppen BM, Stanton BA. Berne y Levy. Fisiología. 6ª ed. Barcelona: Elsevier; 2009. p. 738-757.
 - Young WF. Hipertensión endocrina. En: Melmed S, Polonsky K, Larsen P, Kronenberg H. Williams. Tratado de endocrinología. 13ª ed. Barcelona: Elsevier; 2017. p. 556-587.

ALTERACIONES DEL CRECIMIENTO

Autores: Irene González Martínez, Silvia Díaz Díaz

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Eje hipotálamo-hipofisiario, Hormona del crecimiento, IGF-1

INTRODUCCIÓN

El hipotálamo es el centro de la regulación neuroendocrina, autónoma y homeostásica y actúa como centro integrador coordinando mensajes del entorno, ritmos, patrones de desarrollo endógeno, emociones y señales corporales, para producir de forma integrada, respuestas autónomas tempranas y respuestas endocrinas relativamente tardías. Comprende a la región del cerebro que rodea al sector inferior del tercer ventrículo. La hipófisis o glándula pituitaria, es una estructura del cerebro de pequeño tamaño que se encuentra debajo del tálamo y forma parte del suelo del tercer ventrículo del cerebro. La hipófisis es una glándula endocrina de pequeño tamaño situada en el interior de una estructura ósea llamada silla turca, en la base del cerebro. Está formada por dos lóbulos: la adenohipófisis o lóbulo anterior y la neurohipófisis o lóbulo posterior. Ambos lóbulos se conectan con el hipotálamo a través de un tallo que contiene vasos sanguíneos y proyecciones de las células nerviosas.

La adenohipófisis constituye el 75% de la glándula y se comunica con el hipotálamo a través de vasos sanguíneos que forman el sistema portal hipotálamo-hipofisiario. Está formada por células endocrinas que secretan las siguientes seis hormonas fundamentales: corticotropina (ACTH), somatotropina o hormona del crecimiento (GH), prolactina (PRL), tirotropina (TSH), lutropina o hormona luteinizante (LH) y folitropina o hormona folículo estimulante (FSH). En este capítulo nos vamos a centrar en la hormona del crecimiento (GH).

La neurohipófisis está formada por las terminaciones nerviosas procedentes de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, por lo que el hipotálamo se comunica con la neurohipófisis a través de una vía nerviosa. Estas neuronas del hipotálamo producen oxitocina y vasopresina que viajan a la neurohipófisis donde se almacenan para su secreción en respuesta a estímulos nerviosos.

HORMONA DEL CRECIMIENTO (GH)

La hormona del crecimiento o somatotropina es específica para cada especie animal, por ello en el caso de los humanos sólo podemos responder a la GH humana (hGH), codificada en el brazo largo del cromosoma 17 (17q22-24). Estructuralmente, está formada por una única cadena polipeptídica de 191 aminoácidos con un peso molecular de 21.500 Da y dos puentes disulfuro intramoleculares. En su mayoría, es secretada por las células somatotropas, que constituyen el 50% de la adenohipófisis y almacenada en gránulos intracelulares. Además, las células mamosomatotropas expresan simultáneamente prolactina y GH.

Durante el día, el plasma tiene una concentración de GH estable y relativamente baja (< 2 ng/ml), con varios picos secretores. En contraste, durante la noche, adultos y niños muestran un aumento de la actividad secretora (aproximadamente 90 min antes del inicio del sueño), alcanzando el pico más alto durante el sueño profundo.

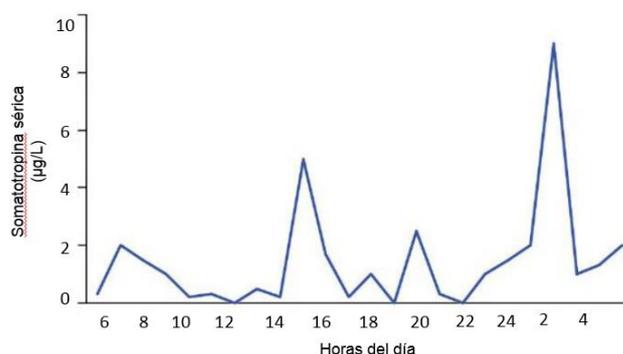


Figura 6. Ritmo circadiano de la concentración de somatotropina sérica. Se aprecian los niveles más elevados a las 3 horas tras las comidas y ejercicio y a los 90 minutos del inicio del sueño profundo. Tomado de: González Hernández A, 2014.

ACCIONES FISOLÓGICAS

La hormona del crecimiento es secretada de forma pulsátil por las células somatotropas de la adenohipófisis y viaja por el torrente sanguíneo unido a proteínas solubles de alta afinidad GHBD dirigiéndose a los órganos diana. Los receptores de hormona del crecimiento, GHR, están ampliamente distribuidos en el organismo especialmente en el hígado.

Cuando la GH se une a su receptor, éste dimeriza y las enzimas JAK2 producen una fosforilación cruzada entre ellas y el propio receptor. A continuación, la JAK2 fosforilada, fosforila a su vez a la proteína STAT5 y se inicia una cascada de señalización que lleva a la activación de diversos factores de transcripción que serán los responsables de la respuesta a la acción de la GH. Mediante este receptor, la GH estimula en el hígado la producción del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1, somatomedina C).

La somatotropina puede ejercer sus acciones biológicas directamente o a través del IGF-1. La acción directa de la GH sobre los diferentes tejidos diana es:

- En primer lugar, en el hígado, se produce la síntesis del efector IGF-1, así como de la proteína transportadora IGFBP, y de la subunidad del ácido lábil ALS.

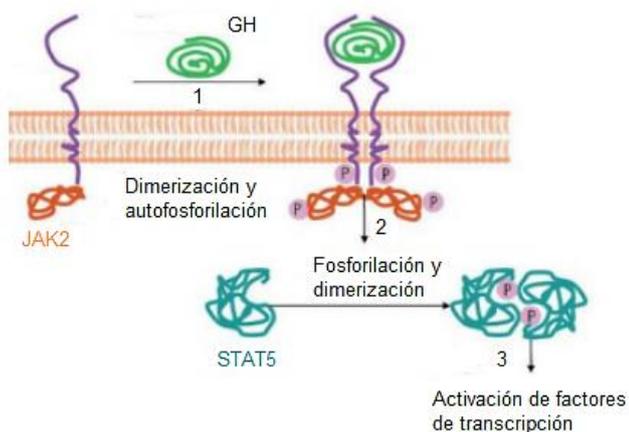


Figura 7. Unión de la hormona del crecimiento a su receptor y activación de la vía de señalización JAK/STAT-cinasa. Adaptado de: González Hernández A, 2014

- Estimula la gluconeogénesis en el hígado y disminuye la captación de glucosa por parte de los tejidos, aumentando la concentración de glucosa en sangre, es decir, tiene una acción hiperglucemiante.
- Incrementa el crecimiento de tejido óseo y la proliferación de cartílago en la epífisis con un aumento en la captación de aminoácidos y proteínas.
- Incremento de la masa muscular.

- El incremento en el crecimiento de tejidos blandos y esqueleto se acompaña de cambios en el metabolismo electrolítico como aumento de la absorción intestinal de calcio y de la concentración de fósforo en plasma y disminución de la secreción urinaria de sodio y potasio.

En cuanto a la acción indirecta de la GH, es ejercida por el efector IGF-1 o factor de crecimiento similar a la insulina o somatomedina C. Su concentración depende de su producción en el hígado en respuesta a la GH. Su acción está ligada a la síntesis y secreción de IGFBP3 y de la subunidad del ácido lábil, ya que el IGF-1 circula unido a estas proteínas formando un complejo ternario de alto peso molecular que aumenta su tiempo de vida media, regula su transporte y su disponibilidad. Debido a la alta afinidad de unión entre el IGF-1 y IGFBP3, su concentración en plasma es mucho más estable que la de la GH. Finalmente, proteasas periféricas, liberan el IGF-1 para su entrada en la célula.

El IGF-1 lleva a cabo muchas de las acciones fisiológicas de la GH de forma indirecta. Su concentración en sangre aumenta desde el nacimiento hasta la pubertad, momento en el cual comienza a descender. Su acción en los tejidos es:

- En el cartílago, estimula la síntesis de DNA y RNA y la formación del colágeno.
- Además de su efecto promotor del crecimiento, muestra actividad similar a la insulina en otros tejidos, incrementando la oxidación de la glucosa

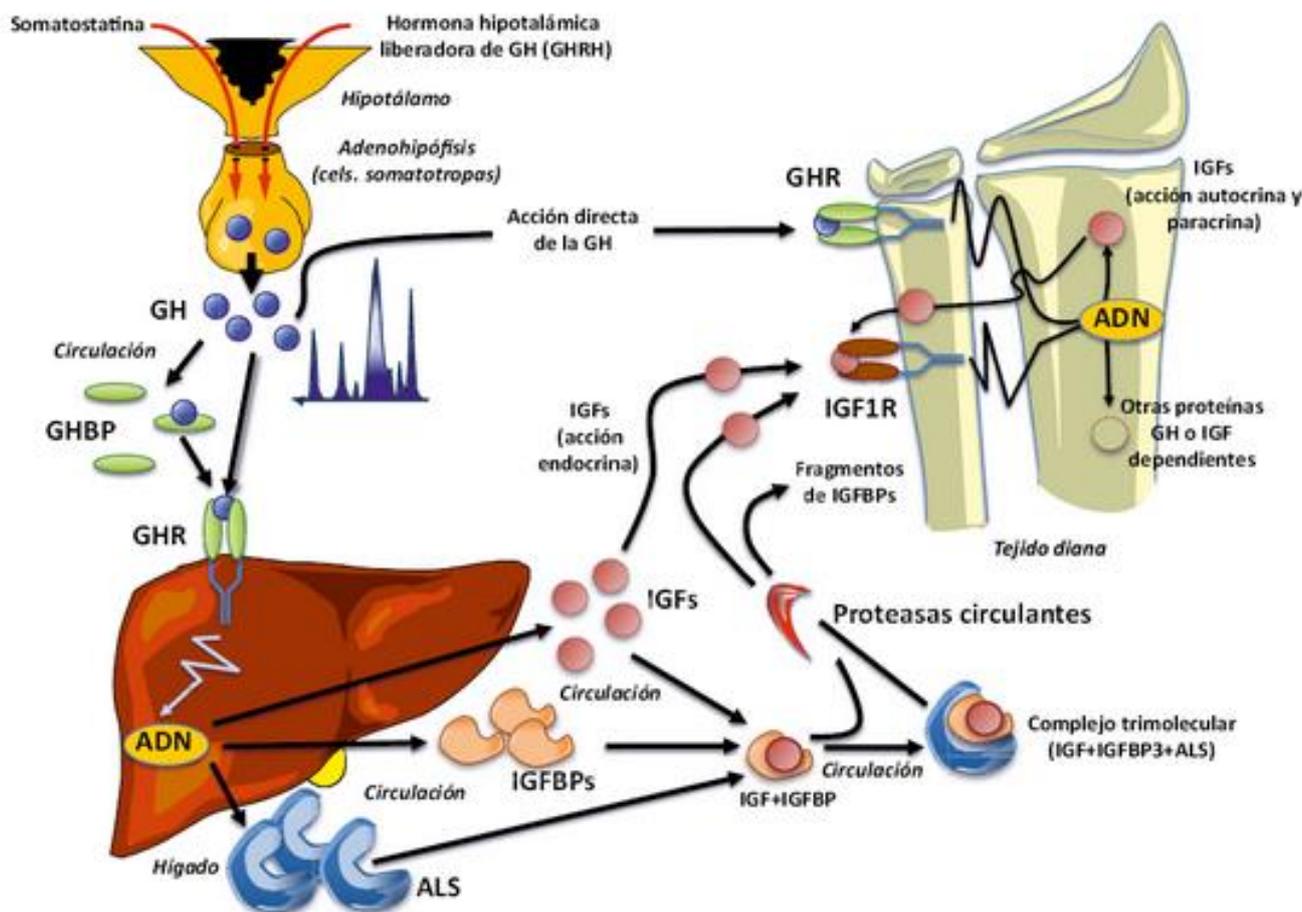


Figura 8. Representación esquemática del sistema GH-IGF1. Tomado de: <https://www.pediatriaintegral.es>

en tejido adiposo y estimulando el transporte de glucosa y aminoácidos.

REGULACIÓN

La liberación de hormona del crecimiento está controlada por dos factores hipotalámicos (somatoliberina y somatostatina) secretados en el sistema de circulación portal desde las terminaciones nerviosas en la eminencia media del hipotálamo hasta las sinusoides capilares de la glándula pituitaria. El sistema portal hipotálamo-hipofisario, transporta las hormonas neurosecretoras procedentes del hipotálamo hasta la adenohipófisis.

- GH-RH (somatoliberina): activan las células somatotropas para liberar hormona del crecimiento. Además de su efecto promotor del crecimiento, muestra actividad similar a la insulina en otros tejidos, incrementando la oxidación de la glucosa en tejido adiposo y estimulando el transporte de glucosa y aminoácidos.
- Somatostatina: inhibe la secreción de hormona del crecimiento. También se encuentran en las células delta del páncreas y otras localizaciones del tracto digestivo.

Parece ser que la influencia del hipotálamo sobre la secreción de hormona de crecimiento es predominantemente inhibitoria a través de la secreción de somatostatina; por ello, una lesión en las conexiones hipotálamo-hipofisarias produce liberación de GH.

- Hormona Ghrelina: es un péptido de pequeño tamaño, liberado por las células neuroendocrinas de la mucosa gástrica. Estimula tanto la secreción de somatoliberina (GH-RH) como la liberación directa de GH.

La secreción de somatoliberina se hace en picos que provocan la liberación pulsátil de GH, mientras que la somatostatina establece el tono basal. Además, la IGF-1 actúa ejerciendo una inhibición sobre la secreción de GH por retroalimentación.

La hormona del crecimiento también se ve inhibida o activada por otros factores. La obesidad, hiperglucemia, ácidos grasos libres e hipotiroidismo producen una supresión de GH, mientras que el ejercicio, el estrés, hipoglucemia, aumento en la cantidad de aminoácidos circulantes, el sueño profundo, ayuno y estrógenos actúan activando la secreción de GH.

PATOLOGÍA

- **Exceso de hormona del crecimiento**

Acromegalia

Esta patología tiene lugar cuando se produce un exceso de la secreción de GH posterior al cierre de las epífisis, es decir, después de la adolescencia. Su incidencia es de 3-4 pacientes por millón de habitantes/año, con una prevalencia de 40-60 personas por millón. El inicio y progresión de la enfermedad son lentos y el intervalo entre el comienzo de los síntomas y el diagnóstico oscila entre 5-10 años. La causa

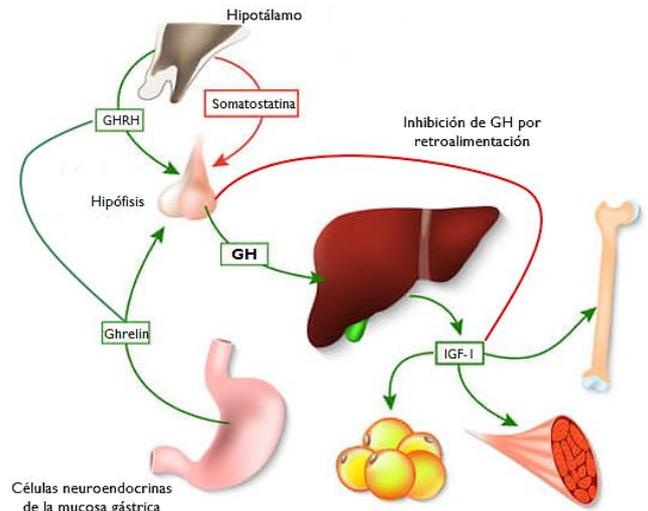


Figura 9. Regulación de la secreción de hormona del crecimiento. Adaptado de: <https://mejorconsalud.com>

más común de acromegalia es el adenoma somatotrofo o adenoma de la hipófisis productor de GH. Los adenomas somatotropos representan un tercio de los adenomas hipofisarios. El 40% de los pacientes son portadores de una mutación de la subunidad alfa de la proteína Gs acoplada con el receptor de la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH). El resto de las causas, todas muy infrecuentes, son el exceso de secreción de GHRH por tumores hipotalámicos, tumores neuroendocrinos o no neuroendocrinos. Los síntomas clínicos de la acromegalia son causados por el exceso de GH o de IGF-1 y síntomas compresivos o derivados del "efecto masa" del adenoma. El exceso de GH estimula la producción hepática de IGF-1 que causa la mayoría de las manifestaciones clínicas.

- Crecimiento acro y de tejidos blandos: es característico de la enfermedad y se produce casi en el 100% de los pacientes con aumento de nariz, pies y manos, macroglosia con facies toscas y rasgos rudos.
- Crecimiento visceral: crecimiento del corazón con hipertrofia ventricular y miocardiopatía y bocio en el 32% de pacientes.
- Alteraciones óseas: artropatía hipertrófica debido al crecimiento del tejido sinovial y cartilago.
- Patología tumoral: entre el 10 y 15% de las muertes de pacientes con acromegalia se deben a tumores malignos.
- Efectos metabólicos:
 - Hiperglucemia, provocando diabetes mellitus en el 25% de los casos.
 - Hiperfosfatemia en el 70% de los pacientes debido a la acción de IGF-1 sobre la absorción de fósforo en el túbulo renal.
 - Hiperprolactinemia en caso de tumores mixtos productores de GH y PRL.

- Sintomatología compresiva: cefalea (70%), alteraciones visuales (25%) y alteraciones en el resto de hormonas.

La supervivencia se relaciona con los niveles de hormona del crecimiento, la duración de la enfermedad y con la presencia de patología cardiovascular, hipertensión o diabetes mellitus en el momento del diagnóstico.

Gigantismo

Esta patología se produce cuando esta hipersecreción ocurre antes del cierre de las epífisis, es decir, durante la infancia. Es un trastorno infrecuente que en la mayoría de los casos se produce por un adenoma hipofisario. Produce un aumento en la velocidad del crecimiento de los huesos largos y conlleva un aumento de la estatura final pero no suele producir deformación ósea. Con frecuencia se produce pubertad tardía o hipogonadismo hipogonadotrópico.

- **Deficiencia de hormona del crecimiento**

Enanismo

El enanismo de Laron es una enfermedad de origen genético caracterizada por una marcada baja estatura. Se asocia a niveles normales de hormona del crecimiento en suero y niveles bajos de IGF-1, que no aumentan tras la administración de GH exógena (mutación en el GHR). Las características físicas de la enfermedad incluyen: frente prominente, puente nasal deprimido, bajo desarrollo de la mandíbula, obesidad troncal y pene pequeño.

Deficiencia de GH en el adulto

Suele deberse a una lesión hipotalámica o de las células somatotropas de la hipófisis. Es el trastorno más frecuente en pacientes con adenomas grandes de la hipófisis o que han sido irradiados en la misma. La deficiencia hormonal hipofisaria sigue un patrón secuencial hormonal típico, en el que la pérdida de la reserva de GH anuncia la posterior deficiencia de otras hormonas. El orden de secuencia de la pérdida hormonal suele ser:

↓ GH → FSH/LH → TSH → ACTH

La deficiencia de hormona del crecimiento en adultos puede llevar a:

- Disminución de la capacidad de esfuerzo.
- Aumento de factores de riesgo cardiovascular.
- Composición corporal anormal. (aumento de grasa corporal).
- Disminución de la masa ósea, aumentando el riesgo de fracturas.
- Deterioro de la calidad de vida.

DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico de patologías asociadas a un exceso o un déficit de hormona del crecimiento es necesario realizar pruebas funcionales. Esto se debe a que la concentración de GH varía ampliamente en condiciones normales y una medida aleatoria de la misma no proporciona mucha información.

- **Test de supresión**

Sobrecarga oral de glucosa (SOG)

El diagnóstico de acromegalia tiene que confirmarse mediante un test de SOG, esta prueba funcional pretende comprobar si la GH se suprime frente a un estado de hiperglucemia que como se ha comentado anteriormente, en situaciones normales, produciría la inhibición de la secreción de la hormona. La ausencia de supresión de GH ante la sobrecarga oral de glucosa refleja una hipersecreción de la misma. El test consiste en una extracción de sangre basal y la posterior administración de 75g de glucosa que se debe ingerir en unos 5 minutos. A continuación, se realizan nuevas extracciones a los 30, 60, 90 y 120 minutos y en ellas se determina la glucosa y la GH. Se considera que se consigue una adecuada supresión cuando la GH post estímulo es inferior a 0.4 ng/dL.

- **Test de estímulo**

Debido a que la secreción de GH (hormona de crecimiento) es pulsátil, para diagnosticar la existencia de una deficiencia en la secreción de GH debe recurrirse a estímulos fisiológicos. Todas las pruebas de estimulación deben de realizarse en ayunas, dado que la mayoría de pruebas pueden ser bloqueadas en presencia de niveles elevados de glucemia y ácidos grasos libres. Se establece como criterios del déficit de GH en niños, la falta de una respuesta aceptable, al menos a dos estímulos de provocación.

Test de hipoglucemia insulínica

Se pretende valorar la reserva de GH y la integridad del eje hipotálamo-hipófisis ya que la hipoglucemia provoca liberación de GH. El test consiste en una extracción de sangre basal y una posterior administración intravenosa de 0.1 U/kg de insulina rápida. A continuación, se realizan nuevas extracciones a los 15, 30, 45, 60 y 90 minutos y se determina la glucosa y GH. Para considerar el estímulo como válido, la glucemia a los 15 minutos debe ser inferior a 40 mg/dL y se considera una respuesta normal una concentración de GH superior a 7.4 ng/mL.

Ejercicio intenso + propranolol

El propranolol es un bloqueante beta-adrenérgico que estimula la liberación de GH y su acción se potencia al asociarse a un estímulo fisiológico como el ejercicio. El test consiste en una extracción de sangre basal y una posterior administración de propranolol. Se debe realizar un ejercicio regular e intenso durante 15 minutos y a continuación realizar otra extracción donde se determina la GH. Se considera una respuesta normal una concentración de GH post-esfuerzo superior a 7.4 ng/mL.

Test de clonidina

La clonidina es un estimulante alfa-adrenérgico que actúa a nivel central sobre la secreción de hormona del crecimiento. El test consiste en una extracción de sangre basal tras un reposo del paciente de 30 minutos. A continuación, se administra de forma oral, la correspondiente dosis de clonidina y se realizan extracciones a los 60, 90 y 120 minutos en las que se determina la GH. Se considera una respuesta normal una concentración de GH post-esfuerzo superior a 7.4 ng/mL.

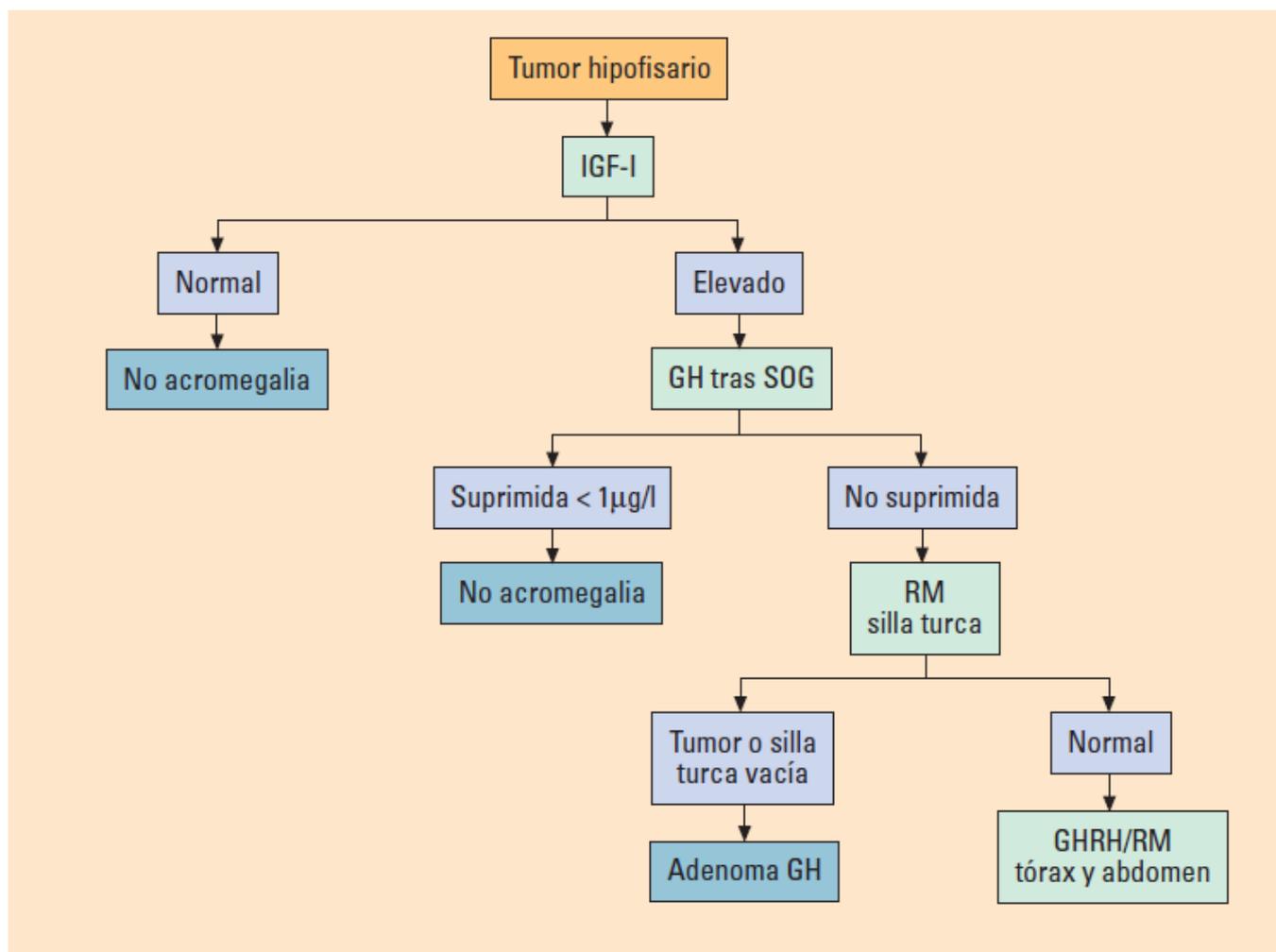


Figura 10. Algoritmo diagnóstico de adenomas productores de hormona del crecimiento. Tomado de: Durán Rodríguez-Hervada A *et al*, 2004

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Alfayete Guerra R, García Lacalle C, Álvarez García E, Audí Parera L, Casatmijana Ybern R, Oriola Ambrós J, et al. Catálogo de pruebas funcionales en endocrinología. Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición en colaboración con la comisión de Hormonas de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Madrid: SEEN; 2013.
- Chapman IM. Gigantismo y acromegalia [Internet]. En: Manual MSD. Versión para profesionales. Kenilworth, NJ: MSD; 2019. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es/professional/trastornos-endocrinol%C3%B3gicos-y-metab%C3%B3licos/trastornos-hipofisarios/gigantismo-y-acromegalia>
- Díaz Merino MS, Gil Ruiz MT. Actualizaciones en el laboratorio clínico: Diagnóstico de la deficiencia de GH por el laboratorio en el adulto. Curso de formación continuada 2010-2011. Comité de Formación continuada. Madrid: Asociación Española de Biopatología Médica; [2010].
- Durán Rodríguez-Hervada A, Díaz Pérez JA, Martín Rojas-Marcos P, Charro Salgado AL. Acromegalia. *Medicine*. 2004;9(13):766-773
- González Hernández A, Alegre Martínez E, Monreal Marquegui I, Mugueta Uriaque C, Restituto Aranguibel P, Varo Cenarruzabeitia N. Hormonas hipofisarias. En: González Hernández A. *Principios de bioquímica clínica y patología molecular*. Barcelona: Elsevier; 2014. p. 225-231.

EMBRIOLOGÍA HUMANA Y BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

Autores: Jon Sánchez Munárriz, Silvia Díaz Díaz

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos. Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Embriología humana, Mola hidatiforme, Coriocarcinoma

INTRODUCCIÓN

La embriología humana, más recientemente denominada “Biología del desarrollo”, es la ciencia que estudia el desarrollo embrionario, razón por la cual se encuentra estrechamente vinculada a áreas de estudio como la anatomía y la histología. El embarazo conlleva un conjunto de cambios fisiológicos y hormonales que comienzan con la fecundación y finalizan, tras una serie de fases en las que el embrión va adquiriendo complejidad, con el nacimiento del nuevo individuo independiente. En este capítulo se pretende resumir todo el proceso de embriogénesis humana con la finalidad de servir de base de conocimiento para comprender algunas de las patologías asociadas como son las molas hidatiformes y los coriocarcinomas.

GAMETOGÉNESIS

La gametogénesis o proceso de formación de los gametos se inicia a partir de las células primordiales germinales (CPG), que son las células precursoras de las células germinales. Las CPG provienen del endodermo del saco vitelino del embrión, que en las primeras etapas del desarrollo migran hasta las gónadas para dar lugar, tras sucesivas mitosis y una meiosis, a los gametos maduros. Se diferencian por su gran tamaño y su elevado contenido en fosfatasa alcalina.

Distinguimos dos tipos de gametogénesis: a) la formación del oocito II en la mujer (ovogénesis); y b) la formación de los espermatozoides en el hombre (espermatogénesis).

- Ovogénesis:

Las CPG migran a los ovarios en desarrollo donde dan lugar a oogonias, que proliferan por mitosis hasta alcanzar los 7 millones en el 5º mes de embarazo, momento en el cual muchas de ellas sufrirán un proceso de atresia. Hacia el séptimo mes las oogonias restantes se diferencian hacia oocitos primarios diploides, formando los folículos primordiales en la corteza ovárica. En el nacimiento, los ovocitos primarios entran en profase I hasta dictioteno. Después del nacimiento no se formarán más oocitos primarios.

A partir de la madurez sexual, cada 28 días por acción de la FSH, entre 15-20 folículos primordiales con oocitos primarios continuarán la división meiótica. Normalmente sólo uno alcanzará la madurez completa y su citoplasma se dividirá asimétricamente dando dos células: un corpúsculo polar y un oocito secundario haploide, conteniendo este último todo el potencial de desarrollo. Este oocito continuará la meiosis II hasta la metafase II, momento en que se detendrá y será liberado por el ovario en la ovulación (ocurre aproximadamente el día 14 del ciclo menstrual). Sólo se

jcompletará la meiosis II si este oocito II es fecundado, dando lugar al segundo corpúsculo polar y al óvulo maduro.

- Espermatogénesis:

A diferencia de lo que ocurre en la ovogénesis, en este caso, las CPG que llegan a los testículos en desarrollo no comienzan la meiosis y permanecen en espera hasta la pubertad. Las CPG originarán células germinales inmaduras llamadas espermatogonias A, que se dividirán continuamente por mitosis, originando así una población de células madre y espermatogonias tipo B, más diferenciadas. Algunas espermatogonias B diferenciarán a espermatozoides primarios diploides que entrarán en meiosis I (dura varias semanas, con una profase muy larga de 22 días) dando espermatozoides secundarios haploides, los cuales sufrirán la meiosis II (unas 8 horas) produciendo 4 espermátidas, con citocinesis incompleta. Las espermátidas completarán su diferenciación morfológica a espermatozoides maduros en la luz del tubo seminífero (proceso denominado “espermiogénesis”, que incluye la formación del acrosoma, la condensación del núcleo, la formación del cuello y cola, la pérdida de volumen citoplasmático y la completa citocinesis).

El proceso de espermatogénesis total dura 64-72 días. No obstante, los espermatozoides no alcanzarán la movilidad completa hasta que tenga lugar el proceso de maduración en el epidídimo. Asimismo, será necesario un proceso de capacitación para poder fecundar al óvulo, el cual ocurre en los oviductos de la mujer por sustancias secretadas por el conducto genital femenino.

FECUNDACIÓN

La fecundación supone el inicio del embarazo. Tiene lugar en la región de la ampolla de las trompas uterinas (proximal al ovario) y conlleva que el oocito secundario finalice la segunda división meiótica, originando el óvulo. La fecundación termina cuando los dos juegos de cromosomas se unen dando lugar a una única célula o cigoto y tiene como resultado el restablecimiento del número diploide de cromosomas y la determinación del sexo del individuo.

PERIODO PREEMBRIÓNARIO

El periodo preembrionario abarca las semanas 1 y 2 del embarazo. Incluye todas aquellas fases por las que pasa el cigoto hasta dar lugar al embrión: a) Segmentación, b) Blastogénesis, c) Implantación, y d) Formación del disco germinativo bilaminar (DGB).

- Segmentación:

Conjunto de mitosis sucesivas que acontecen en el cigoto una vez terminada la fecundación y que originan una agrupación celular llamada mórula. En el estadio de ocho

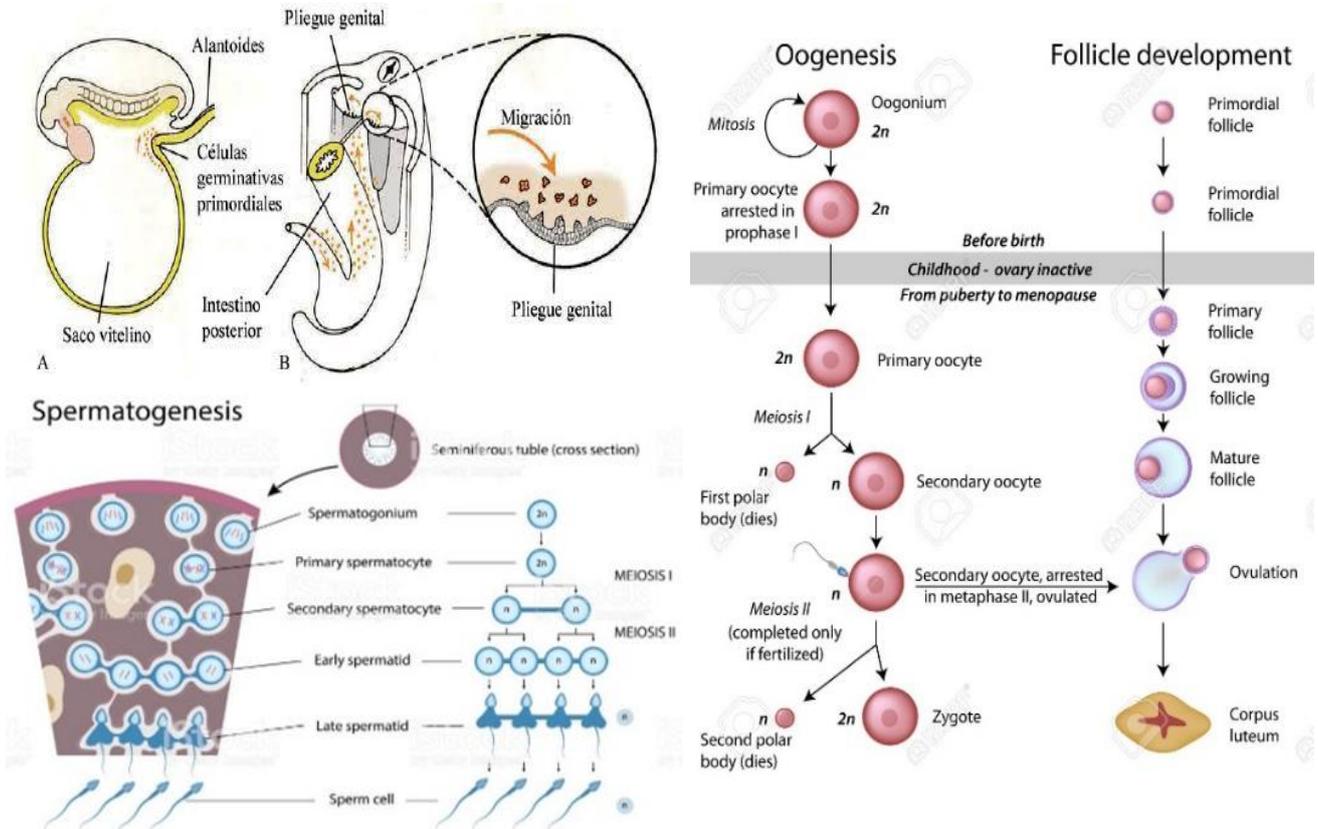


Figura 1. Fenómeno de migración de células primordiales germinales (CPG), esquema de espermatogénesis y de ovogénesis en humanos. Tomados de: <https://www.freejpg.com.ar>

células ocurre el fenómeno de compactación, agrupación compacta de blastómeros por uniones estrechas. La compactación separa las células del exterior de las células internas, que se comunican por uniones gap. Este proceso es necesario para la segregación de células internas que formarán el embrioblasto. Cuando existen 16 células se habla de mórula, con células centrales (masa celular interna, mci) que originarán los tejidos del embrión y células periféricas (masa celular externa, mce) para los tejidos extraembrionarios. La mórula viajará hasta el útero donde llega 3-4 días post-fecundación.

- **Blastogénesis:**

La formación del blastocisto o blástula ocurre en la cavidad uterina cuando en la mórula entra líquido del útero y se forma una cavidad interna llamada blastocele. Las células de la masa celular interna forman el embrioblasto (precursor del embrión), mientras que las células de la masa celular externa originan el trofoblasto (precursor de los tejidos extraembrionarios: porción embrionaria de la placenta). El embrioblasto se sitúa en un polo.

- **Implantación:**

Ocurre hacia el día 6 cuando las células del trofoblasto sobre el embrioblasto se unen por pinópodos de las células epiteliales del endometrio. El sincitiotrofoblasto (células más externas del trofoblasto, tejido celular multinucleado) erosiona la mucosa uterina y penetra en ella. A la vez el

endometrio, en fase secretora, luteínica o progestacional, anida la blástula.

En caso de que la implantación ocurra fuera del útero se producirá un embarazo ectópico. El 95% de los cuales aparece en las trompas de Falopio (embarazo tubárico), aunque hay multitud de localizaciones ectópicas: embarazo cervical, embarazo intersticial, embarazo ovárico, embarazo peritoneal y embarazo abdominal.

- **Formación del disco germinativo bilaminar (DGB):**

Ocurre durante la 2ª semana. El trofoblasto (proveniente de la masa celular externa) da lugar a: citotrofoblasto (capa interna de células mononucleares) y sincitiotrofoblasto (capa externa de células fusionadas). Simultáneamente, en el embrioblasto (proveniente de la masa celular interna) también se originan dos capas, llamadas epiblasto e hipoblasto, que forman el disco germinativo bilaminar o blastodisco. En el interior del epiblasto aparecerá la cavidad amniótica. También se formará el saco vitelino primitivo, de modo que el DGB se localizará entre la cavidad amniótica y el saco vitelino primitivo.

El sincitiotrofoblasto continúa penetrando en el endometrio y aparecen oquedades en su interior denominadas lagunas trofoblásticas de manera que en el día 11-12 el blastocisto estará completamente introducido en el estroma endometrial. En estos días comienza la circulación uteroplacentaria, cuando las células del sincitiotrofoblasto se introducen más

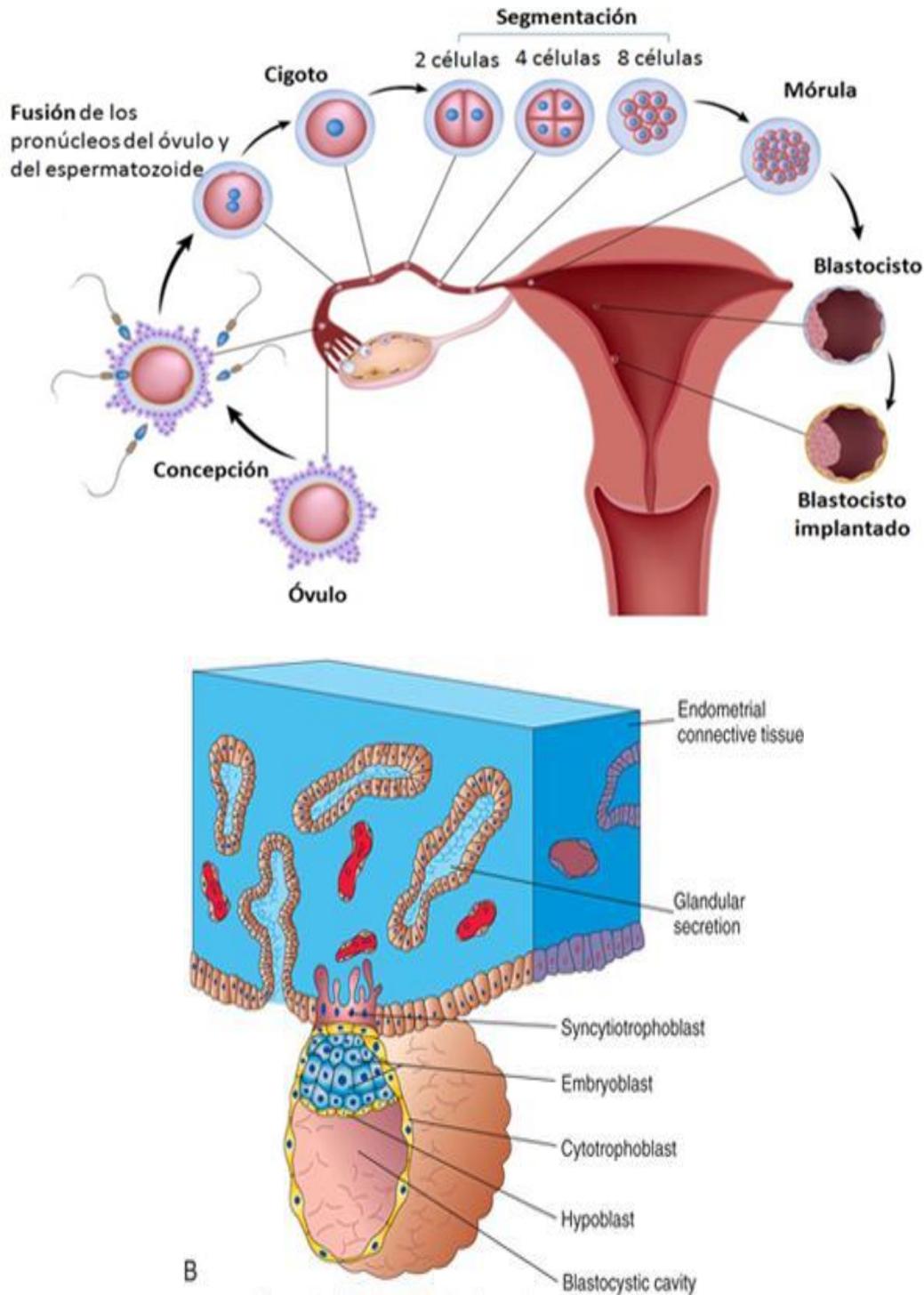


Figura 2. Etapas de segmentación, blastogénesis e implantación. Tipos de embarazo ectópico. Tomadas de: <https://sites.google.com/site/licelotcontrerastroncoso/primer-tema>, T.W. Sadler, 2016

en el endometrio, erosionan los capilares maternos y la sangre materna penetra en las lagunas del sincitiotrofoblasto. Se forma, asimismo, el mesodermo extraembrionario, tejido conjuntivo laxo en el cual aparecen después cavidades pequeñas que se fusionan y forman la cavidad coriónica. De esta forma, queda el preembrión bilaminar con amnios por encima y saco vitelino por debajo, todo ello rodeado de mesodermo extraembrionario, y que se une al corion (parte embrionaria de la placenta compuesto por mesodermo extraembrionario, cito y sincitiotrofoblasto)

por el pedículo de fijación. Finalmente, el día 13-14 aparecen vellosidades cuando el citotrofoblasto empuja hacia dentro del sincitiotrofoblasto en el endometrio.

PERIODO EMBRIONARIO Y PERIODO FETAL

El periodo embrionario comprende desde la semana 3 a la 8 del embarazo. Incluye todas aquellas fases por las que pasa el embrión hasta dar lugar al feto: a) Formación del disco

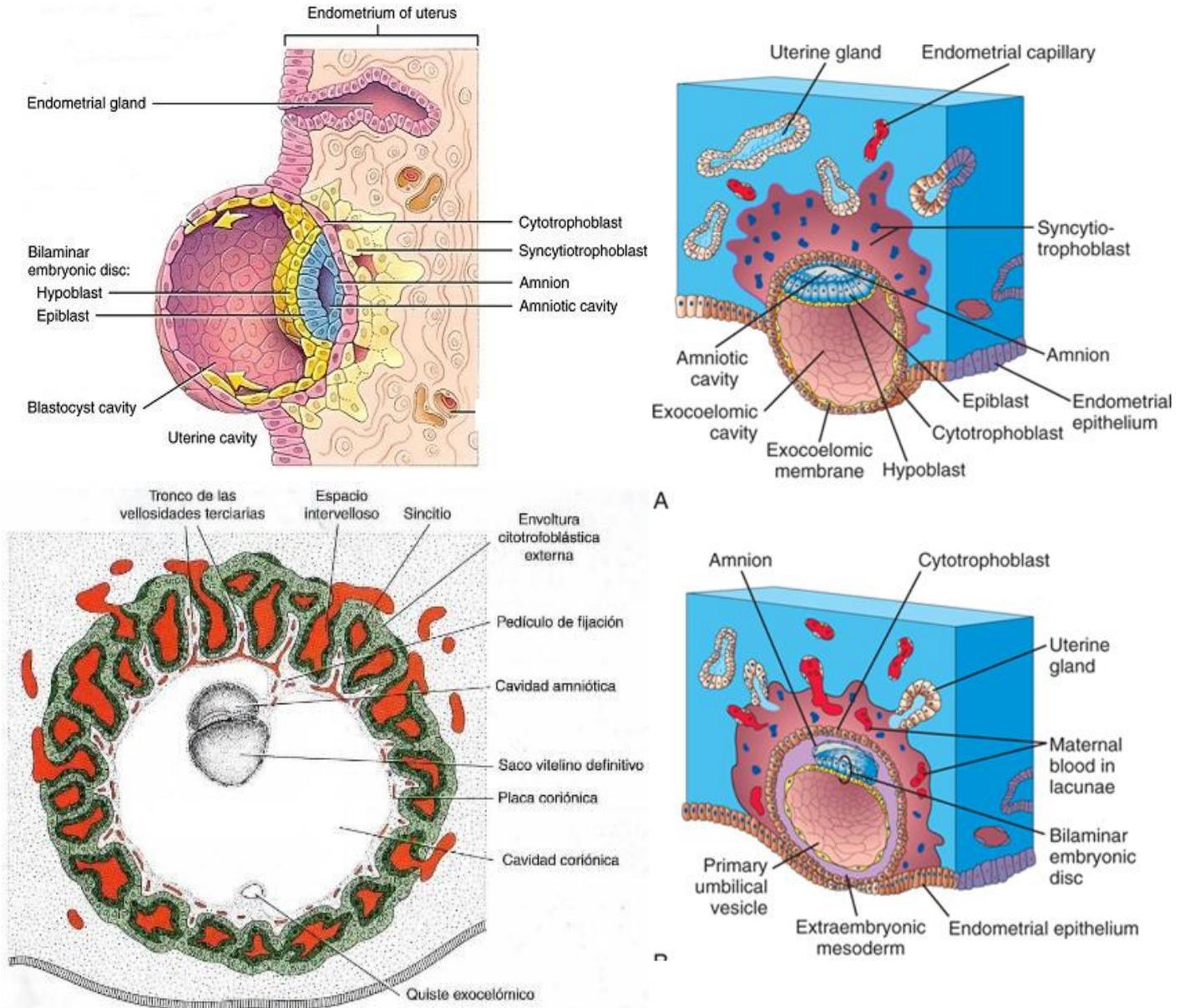


Figura 3. Formación del disco germinativo bilaminar y circulación uteroplacentaria. Tomado de: T. W. Sadler, 2016

germinativo trilaminar (DGT), b) Neurulación, y c) Organogénesis.

- Gastrulación o formación del disco germinativo trilaminar (DGT):

También llamado gastrulación. Comienza con la formación de la línea o estría primitiva, una condensación celular longitudinal en la línea media, en la región posterior de la superficie del epiblasto, por donde las células epiblasticas se invaginan para formar unas capas de células entre el epiblasto y el hipoblasto. De esta manera se origina así el endodermo a partir del hipoblasto y el mesodermo y ectodermo a partir del epiblasto.

- Neurulación:

Formación del tubo neural, primer indicio del sistema nervioso. Ocurre durante los últimos días del primer mes.

- Organogénesis:

En la octava semana el embrión ya tiene aspecto humano, momento en el cual se denomina feto. Las tres capas embrionarias dan lugar a tejidos y órganos. El ectodermo origina el sistema nervioso central, el epitelio sensorial auditivo, nasal y ocular, la epidermis (con pelo y uñas), las glándulas subcutáneas, las glándulas mamarias, la hipófisis y el esmalte dentario. El mesodermo origina la dermis, el sistema muscular, el esqueleto, el sistema urogenital, la pleura, el peritoneo, el pericardio, y las células y vasos sanguíneos. El endodermo, por su parte, origina la mucosa del tubo digestivo, el revestimiento epitelial de tubo digestivo, el revestimiento epitelial del aparato respiratorio, el parénquima de amígdalas, tiroides, paratiroides, hígado, páncreas, estroma reticular de las amígdalas y timo, el revestimiento epitelial de vejiga y uretra, y el revestimiento epitelial de la cavidad timpánica y de las trompas de Eustaquio.

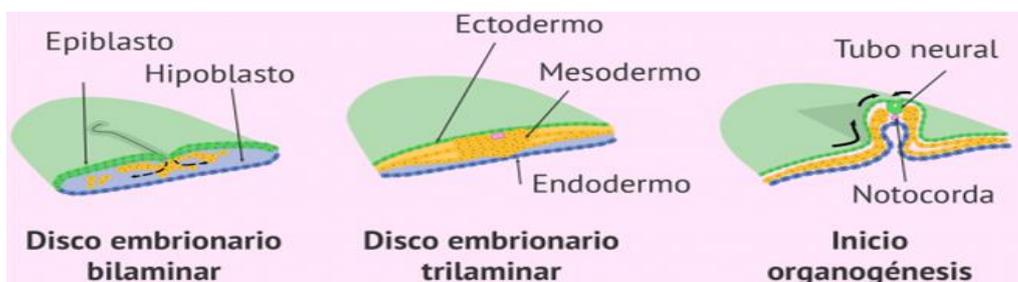


Figura 4. Gastrulación. Neurulación e inicio de organogénesis. Tomado de: <https://www.reproduccionasistida.org>

El periodo fetal comienza la semana 9 y finaliza con el parto. Durante estos meses tendrá lugar la maduración de tejidos y órganos, así como el crecimiento del feto, especialmente durante el tercer trimestre.

ESTRUCTURAS ANEJAS

- Placenta

La placenta humana se trata de un órgano que está constituido, al principio del cuarto mes, por el corion frondoso (componente fetal) y la decidua basal (componente materno). Como se ha mencionado previamente, el corion corresponde a la parte embrionaria de la placenta (mesodermo extraembrionario, citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto). En lo concerniente a la decidua, esta se trata de la capa funcional del endometrio (células con alto contenido en lípidos y glucógeno), que se desprende durante el parto.

La placenta a término pesa unos 500 gramos y es expulsada unos 30 minutos después del parto. Es de tipo hemocoriónica, es decir, la sangre materna está separada de la sangre fetal por un derivado coriónico formando la barrera placentaria. La irrigación de la placenta se produce por las arterias espirales, mientras que la sangre vuelve a circulación materna por las venas endometriales.

La placenta presenta las siguientes funciones básicas:

- **Metabolismo:** Inicialmente sintetiza glucógeno, colesterol y ácidos grasos, que sirven de fuente de energía al embrión-feto.
 - **Intercambio de gases, electrolitos, nutrientes y anticuerpos** por distintos mecanismos de transporte: Los gases (O_2 , CO_2 , CO) y el agua mediante difusión pasiva; la glucosa, aminoácidos y vitaminas mediante difusión facilitada; la IgG y otras proteínas mediante transcitosis. Las hormonas proteicas generalmente no atraviesan la barrera placentaria, y la tiroxina y triyodotironina pasan lentamente la barrera. Por el contrario, las hormonas esteroideas atraviesan con facilidad.
 - **Función endocrina:** La placenta, concretamente el sincitiotrofoblasto, como se explicará en detalle en el siguiente capítulo, es un órgano endocrino muy activo.
- Cordón umbilical

Estructura originada a partir del pedículo de fijación. Su función es unir la placenta al embrión. Si es corto (<30 cm) puede ser causa de dificultad en el descenso, presentaciones anómalas y sufrimiento fetal. Si es largo (>65 cm) puede favorecer la aparición de nudos y prolapso. Tiene 2 arterias y 1 vena rodeados por tejido conjuntivo mucoso.

- Amnios y líquido amniótico

Saco situado alrededor del embrión y del feto. Permite el desarrollo normal del feto, el crecimiento externo simétrico, los movimientos fetales, es barrera a infecciones, amortigua golpes, permite el control de la temperatura e impide adhesión del embrión/feto al amnios. Con la amniocentesis (extracción de líquido amniótico a partir de 14-16 semana de gestación) se pueden hacer pruebas bioquímicas: alfafetoproteína (AFP), surfactante pulmonar, diagnóstico de cromosomopatías, etc. Existen dos situaciones patológicas relacionadas:

- **Oligohidramnios:** Volumen bajo de líquido amniótico (<500 mL en el 3º trimestre), debido a insuficiencia placentaria, rotura de membrana amniocoriónica, agenesia renal o muerte fetal.
- **Polihidramnios:** Volumen alto de líquido amniótico (>2 litros en el 3º trimestre). Son idiopáticas (35%), diabetes materna (25%), anomalías congénitas (anencefalia, atresia esofágica, etc.).

NACIMIENTOS MÚLTIPLES

Los nacimientos múltiples pueden ser de dos tipos: gemelos monocigóticos o gemelos dicigóticos:

- Gemelos monocigóticos:

Se forman a partir de un mismo cigoto que se divide en dos embriones, por lo que se comparte un único genotipo y sexo. Asimismo, en función del momento en que ocurre la división celular se distingue:

- **Gemelos bicoriales-biamnióticos:** Dos sacos amnióticos y dos placentas. Esto ocurre cuando la separación del embrioblasto tiene lugar en las 72 horas tras la fecundación.
- **Gemelos monocoriales-biamnióticos:** Una placenta y dos bolsas amnióticas. Esto sucede cuando la división ocurre entre los 4-8 días tras la fecundación.
- **Gemelos monocoriales-monoamnióticos:** Una placenta y una bolsa amniótica. Esto aparece

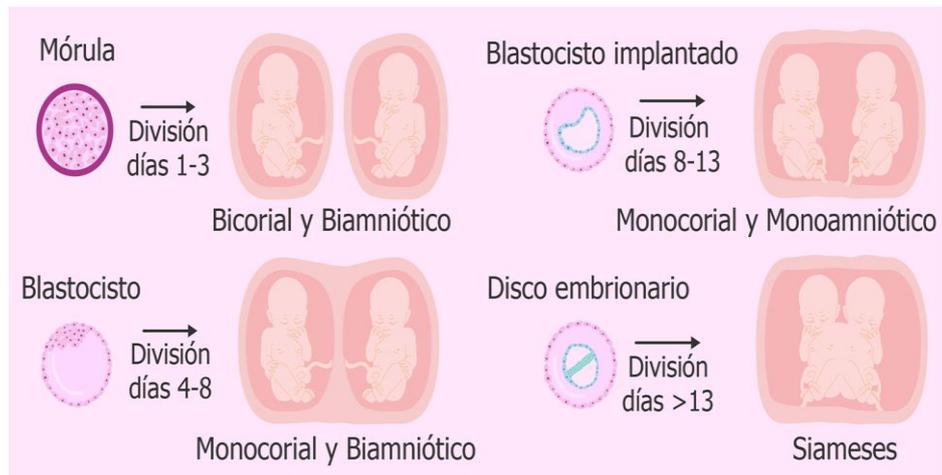


Figura 5. Tipos de gemelos monocigóticos. Tomado de: <https://www.reproduccionasistida.org>

cuando la separación del disco embrionario ocurre pasados ocho días tras la fecundación.

- Gemelos siameses: Si la división se produce después de la segunda semana, el embrioblasto no llega a dividirse por completo y los gemelos permanecen unidos.
- Gemelos dicigóticos:

Resultado de la fecundación de dos ovocitos expulsados en el mismo ciclo menstrual, por dos espermatozoides, por lo que ambos gemelos tendrán distinto genotipo. Siempre son bicoriales-biamnióticos, aunque en ocasiones pueden fusionarse.

MOLA HIDATIFORME

Las molas hidatiformes son productos anormales de la fecundación con tejidos anormales: tejido trofoblástico hiperplásico que rodea una masa celular interna hipoplásica. Tiene una prevalencia de 1/1000 embarazos y entre sus principales factores de riesgo se encuentran: la edad de la madre superior a 35 años o inferior a 20 años, así como un embarazo molar anterior. En la mola hidatiforme hay un crecimiento anormal del trofoblasto, por lo cual se ve asociada a niveles muy elevados de hCG.

Para comprender cómo se originan las molas es importante conocer que en humanos y otros mamíferos los genes paternos son imprescindibles para el desarrollo del trofoblasto, mientras que los genes maternos son necesarios para el desarrollo del embrioblasto. Esta expresión diferencial se explica por el *imprinting* o impronta genética, fenómeno en el cual la expresión de un gen depende de si es heredado del padre o de la madre. Estos genes no siguen un patrón de herencia mendeliana sino atribuible a mecanismos de epigenética. Estos fenómenos se pueden observar en las molas hidatiformes.

Se distinguen dos tipos de molas hidatiformes:

- Mola hidatiforme completa: Tejido que sólo consta de trofoblasto, que origina una placenta desorganizada, carente por tanto de embrión o feto. Citogenéticamente, las células tienen 46

cromosomas, pero sólo de origen paterno. Se producen por fecundación de un ovocito secundario vacío (que ha perdido el juego de cromosomas) por dos espermatozoides o por uno que sufre endorreduplicación. La situación contraria, un ovocito secundario que se desarrolla sin ser fecundado por un espermatozoide se llama partenogénesis y no se ha descrito en humanos. En un embarazo molar completo, se fecunda un óvulo vacío con uno o dos espermatozoides y todo el material genético proviene del padre. Los cromosomas del óvulo de la madre se pierden o inactivan.

- Mola hidatiforme parcial: Formada por tejido placentario desorganizado y embrión malformado con células triploides (69 cromosomas), en los que 46 cromosomas son paternos y 23 son maternos. La doble contribución paterna puede ocurrir por dispermia o por duplicación de un juego cromosómico haploide del espermatozoide en un proceso de endorreduplicación. En estos embarazos el feto nunca llega a término. En un embarazo molar parcial permanecen los cromosomas de la madre, pero el padre provee dos grupos de cromosomas. El embrioblasto no se desarrolla y el trofoblasto se desarrolla en exceso.

En cuanto a los síntomas, se parece a un embarazo normal al principio, pero después no. Esta patología está asociada a sangrado durante el primer trimestre, náuseas, vómitos, presión o dolor pélvico, eliminación por vía vaginal de quistes en forma de uva, hipertensión, preeclampsia, quistes ováricos, anemia e hipertiroidismo. Después de extracción quirúrgica de la mola hidatiforme es posible que quede tejido molar y que continúe creciendo, dando lugar a un coriocarcinoma.

CORIOCARCINOMA

Tumor maligno con gran capacidad de diseminación, que se desarrolla a partir de las células trofoblásticas (células que ayudan al embrión a implantar en el útero y que forman parte

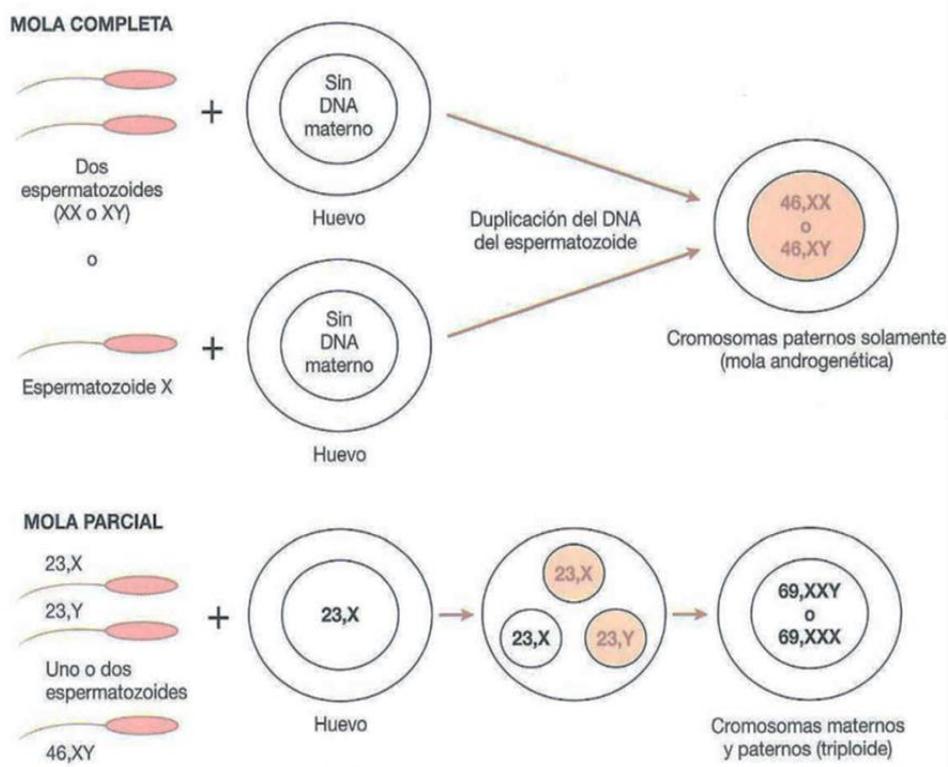


Figura 6. Génesis de mola hidatiforme completa y mola hidatiforme parcial. Tomado de: F. Gary Cunningham *et al*, 2011

de la placenta). Estas diseminan hacia útero y, por vía sanguínea, hasta pulmones, principalmente. Entre los factores de riesgo se encuentran la edad materna menor de 20 años o mayor de 39 años, la edad paterna mayor de 40 años, una historia previa de enfermedad trofoblástica y el consumo de anticonceptivos orales.

El coriocarcinoma puede presentarse después de un embarazo normal; sin embargo, en un 50% de los casos se presenta como una mola hidatiforme completa. Los coriocarcinomas también pueden ocurrir después de un embarazo precoz que no continúa (aborto espontáneo), así como presentarse después de un embarazo ectópico o un tumor genital, por lo que la β -hCG se encuentra elevada.

En lo concerniente a los síntomas, suele presentarse con sangrado vaginal anormal o irregular, síntomas respiratorios (disnea, tos, infiltrados pulmonares), síntomas gastrointestinales (náuseas, vómitos, dolor intrauterino), pérdida de peso, anemia, inflamación de ganglios linfáticos y, en fases terminales, hemorragia transvaginal, taquicardia, desaturación, muerte.

Presenta metástasis generalmente en pulmones, hígado, cerebro y riñón. Debido a la presencia de metástasis prematuras hacia varios órganos como el pulmón, cuando no son tratadas a tiempo conlleva la supervivencia muy corta y la mortalidad elevada. No obstante, a pesar de ser un tumor bastante agresivo, puede ser curable cuando es diagnosticado de forma oportuna, aun cuando existe

metástasis. Esto es debido a que es uno de los tumores más sensibles a la quimioterapia.

El tratamiento de elección consiste en la combinación de quimioterapia, radioterapia y cirugía. Más del 90% de pacientes se cura, aún en casos metastásicos. Asimismo, prácticamente la totalidad de las pacientes sin metástasis pueden ser curadas. Sin embargo, en caso de metástasis a hígado o cerebro la enfermedad puede ser mortal.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Carlson BM. Embriología humana y biología del desarrollo. 6ª ed. Barcelona: Elsevier; 2020.
- Cunningham FG, et al. Williams Obstetricia. 23ª ed. McGraw-Hill; 2011.
- González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 2ª ed. Barcelona: Elsevier España; 2014.
- Hall JE. Guyton y Hall. Tratado de Fisiología médica. 12ª ed. Barcelona: Elsevier Saunders; 2011.
- Moore KL, et al. Embriología clínica. 11ª ed. Barcelona: Elsevier; 2020.
- Pérez Arellano JL. Manual de Patología General. 6ª ed. Barcelona: Elsevier Masson; 2011.
- Sadler TW. Langman. Embriología médica. 13ª ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.

SEGUIMIENTO DE LA GESTACIÓN EN EL LABORATORIO

Autores: Jon Sánchez Munárriz, Ilenia Liria González

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos. Hospital 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Diabetes gestacional, Preeclampsia, Colestasis intrahepática del embarazo

INTRODUCCIÓN

El embarazo es un estado asociado a una compleja variación a nivel hormonal y bioquímico que conlleva una alteración del ciclo ovárico normal de la gestante, todo ello debido a que la placenta es un órgano con muy elevada acción endocrina. El presente capítulo tiene por objeto el estudio del embarazo por parte del laboratorio clínico, haciendo especial énfasis en el componente hormonal y en el estudio de tres patologías como son la diabetes gestacional, la preeclampsia y la colestasis intrahepática gestacional. Asimismo, se detalla la relevancia del laboratorio en el estudio del periodo neonatal.

CICLO OVÁRICO

El ciclo ovárico normal de la mujer puede dividirse en tres fases atendiendo al estado de desarrollo del folículo en el ovario (Figura 1):

- Fase folicular:

En esta fase, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona secretada por el hipotálamo, estimula la secreción de hormona foliculoestimulante (FSH) por parte de la hipófisis, que a su vez estimula el crecimiento de folículos primarios. El folículo en desarrollo produce estrógenos, los cuales ejercen retroalimentación negativa (*feedback* negativo) sobre el eje hipotálamo-hipofisario.

- Fase ovulatoria:

El folículo maduro secreta gran cantidad de estrógenos, los cuales, durante estos días, de manera excepcional, poseen un efecto de retroalimentación positiva (*feedback* positivo) sobre la secreción hipofisaria de FSH y, sobre todo, de hormona luteinizante (LH). La LH estimula así intensamente la secreción de estrógenos y progesterona.

- Fase luteínica:

Las altas concentraciones de LH estimulan la transformación de las células de la granulosa y de la teca del folículo en células secretoras (luteínicas) que descienden la producción de estrógenos y determinan la producción mayoritaria de progesterona. El folículo se convierte en cuerpo lúteo. La progesterona, producida por el cuerpo lúteo prepara al endometrio del útero para la implantación.

Si no hay fecundación, el cuerpo lúteo degenerará y tendrá lugar, como consecuencia, la menstruación. Los niveles de progesterona y estrógenos disminuirán al final de la fase luteínica y los niveles de LH y FSH comenzarán a aumentar nuevamente, lo que es una señal de inicio de un nuevo ciclo.

En caso de haber embarazo, el embrión en desarrollo secretará gonadotropina coriónica humana (hCG), que prolongará la vida del cuerpo lúteo lo suficiente hasta que se forme la placenta y esta pueda mantener los niveles de estrógenos y progesterona por sí misma durante el resto del embarazo.

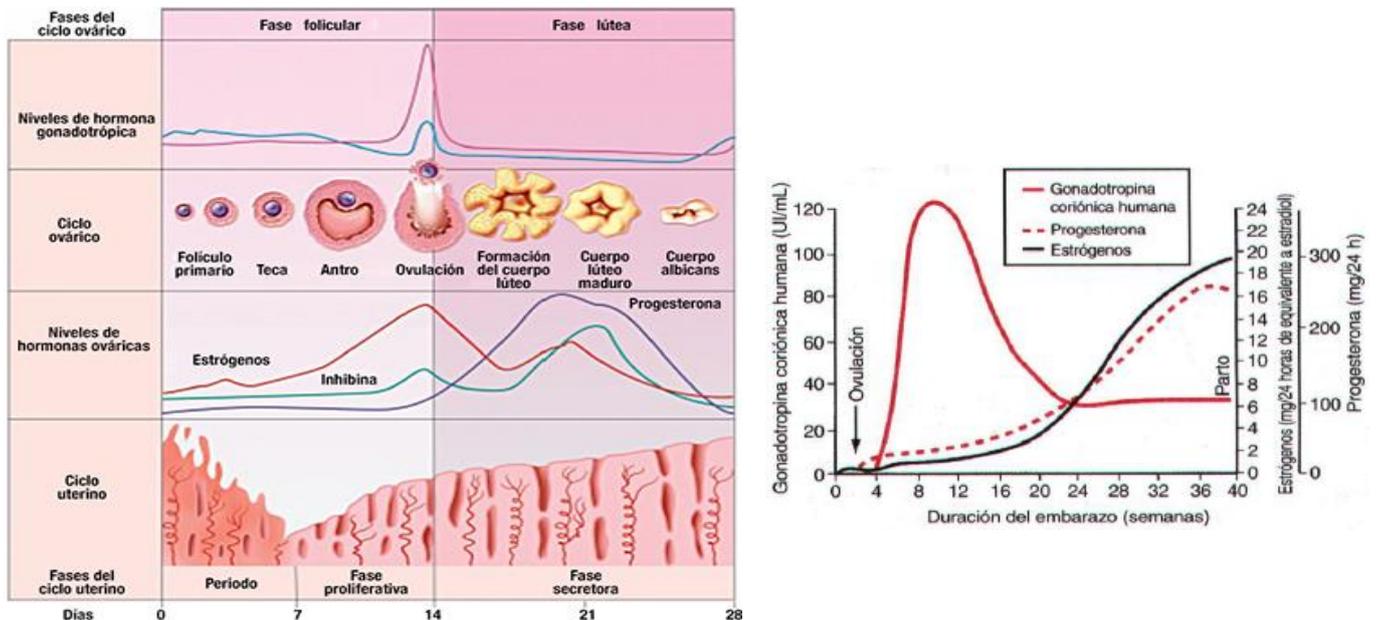


Figura 1. Representación esquemática del ciclo ovárico y uterino normal. Representación de las variaciones hormonales de hormona gonadotrópica, estrógenos y progesterona en ciclo normal y durante el embarazo. Obtenido de: Guyton et al., 2011

HORMONAS PLACENTARIAS

Como ya se ha indicado en el anterior apartado, existen principalmente dos tipos de hormonas ováricas, secretadas por el folículo, y cuya naturaleza es esteroidea: los estrógenos, como el estradiol o el estriol; y los gestágenos, como la progesterona o la 17- α -OH-progesterona. Ahora bien, el principal componente hormonal durante el embarazo proviene de las hormonas secretadas por la placenta. La monitorización del estado hormonal de la mujer permite conocer si el embarazo está sucediendo con normalidad. A continuación, se describen las principales hormonas relacionadas con la gestación:

- **Gonadotropina coriónica humana (hCG):**

Secretada por el embrión en desarrollo y posteriormente por la placenta, presenta elevada acción luteotrófica (al principio de la gestación mantiene el cuerpo lúteo hasta que la placenta ya produce suficiente progesterona) y tiene como funciones promover la síntesis de esteroides en la unidad fetoplacentaria y estimular la síntesis de testosterona en el testículo fetal. Alcanza niveles máximos hacia la semana 8-9, momento en el cual comienza a disminuir su concentración; y se utiliza como indicador de embarazo ya que es detectable a los 8-9 días de la ovulación o un día después de la implantación. Niveles elevados de hCG se ven asociados a molas hidatiformes, cromosomopatías o embarazo gemelar. Un descenso brusco sugiere interrupción del embarazo.

- **Somatotropina o lactógeno placentario (hPL):**

Glucoproteína sintetizada por la placenta a partir de la 5ª semana, similar a la GH, pero con poco efecto sobre el crecimiento fetal. Es diabotogénica para la madre, es decir, confiere prioridad al feto sobre la glucosa sanguínea materna. Además, es lipolítica en la gestante para proporcionar ácidos grasos como fuente principal de energía. Estimula la síntesis proteica en el feto y también estimula el crecimiento de las mamas.

- **Estrógenos:**

Sintetizados por ovario y glándulas suprarrenales, los más representativos son el estradiol (en mujeres en edad reproductiva), la estrona (en menopausia) y el estriol (embarazo, por acción placentaria). Durante el embarazo, son producidos por el ovario, la placenta y el feto, siendo el estriol el estrógeno predominante, que se detecta en circulación materna a medida que el embarazo progresa.

El estriol es indicador de bienestar fetal, útil en la monitorización de hipertensión, diabetes, preeclampsia, insuficiencia placentaria, nefropatías y aneuploidías. Permite el desarrollo del epitelio ciliado (cuya finalidad es propulsar el óvulo fecundado hacia el útero), facilita la implantación y nutrición, favorece el crecimiento del útero, mama y genitales externos para facilitar el paso del feto por el conducto obstétrico y prepara la mama para la lactancia (en presencia de PRL o GH). También, presenta cierto efecto mineralocorticoide de retención de agua y sodio.

Los estrógenos son responsables de la aparición de los caracteres sexuales femeninos primarios y secundarios.

- **Progesterona:**

Se trata del principal gestágeno y es secretado por el cuerpo lúteo, las glándulas suprarrenales y la placenta (al final del 4º mes únicamente por la placenta). Es utilizada por el feto como precursor de glucocorticoides, estimula las secreciones nutritivas necesarias para el desarrollo de la mórula y del blastocisto, disminuye la actividad del útero grávido y prepara la mama para la lactancia.

Como ya se ha mencionado, la progesterona en la mujer no grávida sólo se segrega durante la segunda mitad del ciclo ovárico y toda ella procede del cuerpo lúteo. En el embarazo, esta función la desempeña principalmente la placenta. Si no hay fecundación, el cuerpo lúteo degenera y disminuye la producción de estrógenos y de progesterona de forma brusca.

- **Relaxina:**

Produce la relajación de ligamentos pelvianos y ablanda el cuello uterino en el parto.

- **Corticotropina coriónica:**

Durante el embarazo, la adenohipófisis aumenta de tamaño lo que se traduce en mayor secreción de corticotropina, tirotropina y prolactina. De este modo, incrementa la secreción de corticoesteroides, causantes a menudo de hipertensión gestacional.

- **Tirotropina coriónica:**

Responsable del aumento de tiroxina y del metabolismo basal.

- **Prolactina**

Estimula el desarrollo de la glándula mamaria, la producción de leche durante el embarazo y después del parto, así como la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo.

- **Oxitocina:**

Secretada por la neurohipófisis, estimula la contracción uterina durante el parto, junto al aumento de la relación estrógenos/progesterona. También promueve el proceso de eyección de la leche.

MONITORIZACIÓN DE LA GESTANTE EN EL LABORATORIO

La variación del estado hormonal ejerce un fuerte impacto sobre la mujer, por lo que es importante realizar un control periódico del hemograma, la coagulación y de numerosos parámetros bioquímicos. Durante el embarazo es característico observar:

- Aumento del metabolismo basal: Sensación de calor e incremento de la frecuencia respiratoria.
- Aumento de peso: Efecto mineralocorticoide.
- Aumento de secreción de PTH: Se incrementa la resorción de calcio del hueso para proporcionar calcio al feto/lactante, de ahí la importancia de suministrar vitamina D a la gestante.

- Déficits nutricionales de calcio, fosfato, hierro y vitaminas. Se observa anemia hipocrómica en el 50% de las embarazadas.
- Aumento de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres.
- Aumento del filtrado glomerular y del aclaramiento de creatinina, urea y ácido úrico.
- Poliuria, glucosuria y proteinuria: Mayor formación de orina durante el embarazo (mayor ingesta de líquidos y mayor necesidad de eliminar productos de desecho).
- Hemodilución fisiológica: El flujo sanguíneo y el gasto cardíaco aumentan durante el embarazo. También aumenta el volumen de sangre por mayor retención de líquidos.
- Coagulopatías y tromboembolismo: Aumentan los niveles de fibrinógeno y los factores de coagulación VII, VIII, IX y X y disminuyen los factores XI, XIII, TP. Asimismo, desciende el TTPa: aumento de riesgo de tromboembolismo.

El diagnóstico tanto no invasivo (TPNI, DNA fetal circulante en sangre materna) como invasivo (amniocentesis, cordocentesis y biopsia de vellosidad corial), que se explicará en un capítulo siguiente, es clave, junto a la evaluación de la translucencia nucal por ecografía, para el cribado de anomalías cromosómicas y defectos del tubo neural. En la trisomía 21 se observa incremento de la β hCG e inhibina A junto a la disminución de la AFP y del uE3. Sin embargo, en las trisomías 13 y 18 se detecta un descenso en los niveles de β hCG. La hormona PAPP-A, por su parte, se ve disminuida en embarazo ectópico, aneuploidías y abortos. En cuanto a los defectos del tubo neural, cabe destacar un aumento de AFP.

Cabe destacar la importante función que desempeña el laboratorio en el cribado prenatal del primer trimestre mediante las determinaciones de β HCG libre y de PAPP-A. Estas determinaciones son claves, junto a la evaluación de determinados antecedentes maternos (por ejemplo, edad, procedencia geográfica o IMC) y parámetros ecográficos del feto (longitud craneo-caudal, translucencia nucal y presencia de hueso nasal, entre otros) para el cribado de anomalías cromosómicas y defectos del tubo neural. En la trisomía 21 se observa incremento de la β hCG. Sin embargo, en las trisomías 13 y 18 se detecta un descenso en los niveles de β hCG. La hormona PAPP-A, por su parte, se ve disminuida en embarazo ectópico, aneuploidías y abortos. En aquellos embarazos en los que se obtenga riesgo de trisomía se llevarán a cabo estudios genéticos no invasivos (TPNI, DNA fetal circulante en sangre materna) como invasivos (amniocentesis, cordocentesis y biopsia de vellosidad corial).

En lo concerniente al estudio microbiológico, es necesario realizar un estudio serológico para sífilis, hepatitis B, toxoplasma, VIH, rubeola, así como realizar cultivos de orina y citología para prevenir infecciones que puedan provocar daños en el feto.

Por último, es necesario vigilar una serie de patologías asociadas al embarazo que se explicarán en detalle a

continuación: la incompatibilidad ABO/Rh, la diabetes gestacional (DG), la preeclampsia y la colestasis intrahepática del embarazo (CIE).

INCOMPATIBILIDAD ABO/Rh

■ Incompatibilidad ABO:

Se trata del tipo más frecuente de incompatibilidad, si bien en la mayoría de los casos no produce hemólisis grave. Tiene lugar cuando la madre genera anticuerpos contra antígenos de grupos sanguíneos A, B o AB, por lo que ocurre principalmente en madres con grupo O. No obstante, además de la discrepancia entre grupo sanguíneo es necesario que los anticuerpos sean de isotipo IgG, pues son los únicos que atraviesan la placenta. Algunas madres presentan una pequeña población de anticuerpos G contra antígenos ABO.

■ Incompatibilidad Rh:

Forma más peligrosa de la enfermedad (Figura 2). Tiene lugar cuando la madre es Rh-negativo y el bebé en el útero presenta células Rh-positivo. Al igual que sucede en el apartado anterior se necesita, además de la discrepancia Rh, que la madre haya entrado en contacto con sangre fetal durante el parto de un primer embarazo de hijo Rh-positivo, momento en el que se inmuniza produciendo anticuerpo anti-Rh de tipo IgG.

De este modo en el segundo embarazo, si el feto vuelve a ser Rh+, estos anticuerpos atravesarán la placenta causando enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN). Esta patología se puede prevenir en la mayoría de los casos administrando inmunoprofilaxis durante el parto con globulina hiperinmune Rh (RhoGAM) durante el primer embarazo. La globulina hiperinmune Rh provoca la destrucción rápida de los eritrocitos del feto que hayan entrado en circulación materna, impidiendo que la madre se inmunice, esto es, que genere anticuerpos IgG antiRh.

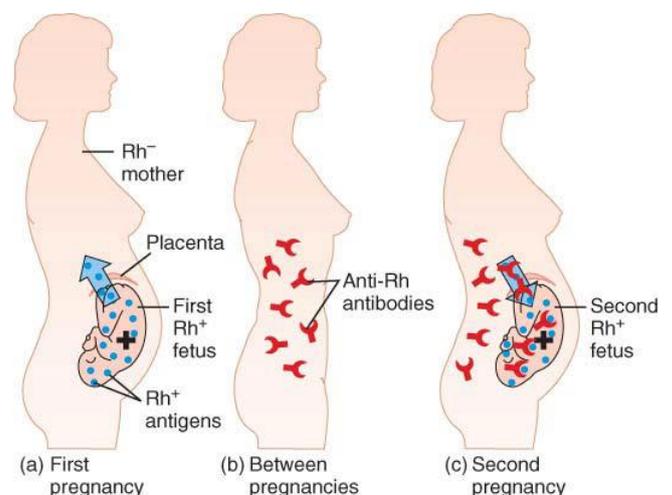


Figura 2. Incompatibilidad Rh. Obtenido de <https://sites.google.com/site/eritroblastosisfetalesm/home/causas-de-la-eritroblastosis-fetal/fisiopatogenia-de-la-eritroblastosis-fetal>

DIABETES GESTACIONAL

Intolerancia a los hidratos de carbono que da lugar a hiperglucemia de severidad variable, de inicio o primer reconocimiento durante el embarazo. Esta condición sucede en el 10% de los embarazos y se debe a que las hormonas producidas por la placenta inducen resistencia de los tejidos maternos a la insulina, lo cual conlleva un aumento de la glucemia. El lactógeno placentario, hormona diabética para la madre, confiere prioridad al feto sobre la glucosa sanguínea materna. Durante el embarazo hay una adaptación materna destinada a suplir las necesidades metabólicas del feto: incremento de niveles de insulina y cambios de la sensibilidad a la misma. Tras la ingesta hay una hiperglucemia y una hiperinsulinemia más prolongada para asegurar un aporte postprandial sostenido de glucosa al feto. Asimismo, al final del embarazo, la madre utiliza fuentes de hidratos de carbono alternativas, reservando la glucosa para el feto.

Los síntomas son los característicos de toda diabetes: polidipsia, poliuria y polifagia. No obstante, aumenta el riesgo de complicaciones obstétricas: macrosomía, sufrimiento fetal, muerte intrauterina, hipoglucemias en neonato, hipertensión y preeclampsia. La glucemia retorna a valores normales después del parto generalmente, si bien aumenta riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2.

Existen dos tipos de pruebas diagnósticas de diabetes gestacional:

- Test de O' Sullivan (cribado): Consiste en la administración oral de 50g de glucosa y la medición de la glucosa basal y a los 60 minutos. Posee una sensibilidad del 80% y se puede realizar a cualquier hora del día, sin necesidad de ayuno previo ni dieta especial previa a la prueba.
- Sobrecarga oral de glucosa (SOG) (test de confirmación): Consiste en la administración oral de 100g de glucosa y la medición de la glucosa basal, así como a las 1, 2 y 3h. Esta prueba debe realizarse a primera hora de la mañana, en ayuno de 10-12 horas y con una dieta que contenga una cantidad igual o superior a 150g/día de hidratos de carbono con actividad física normal los tres días previos a la prueba. Durante la prueba es necesario mantenerse en reposo, sentada y abstenerse de fumar.

El algoritmo diagnóstico de la diabetes gestacional (Figura 3) distingue dos grupos de embarazadas: 1) con riesgo alto, con antecedentes familiares de diabetes mellitus, edad igual o superior a 35 años, diabetes gestacional previa, macrosomía mayor de 4Kg u obesidad con IMC mayor a 30; y 2) con riesgo bajo-moderado, que no presentan estos factores de riesgo.

Como se puede observar en la figura 3, si el riesgo es alto se realizará la prueba de O' Sullivan durante el primer trimestre. En caso contrario, se realizará durante el segundo trimestre (despistaje universal). En el tercer trimestre únicamente se hace para aquellas embarazadas que por lo que fuera no se estudiaron durante el segundo trimestre y aquellas que,

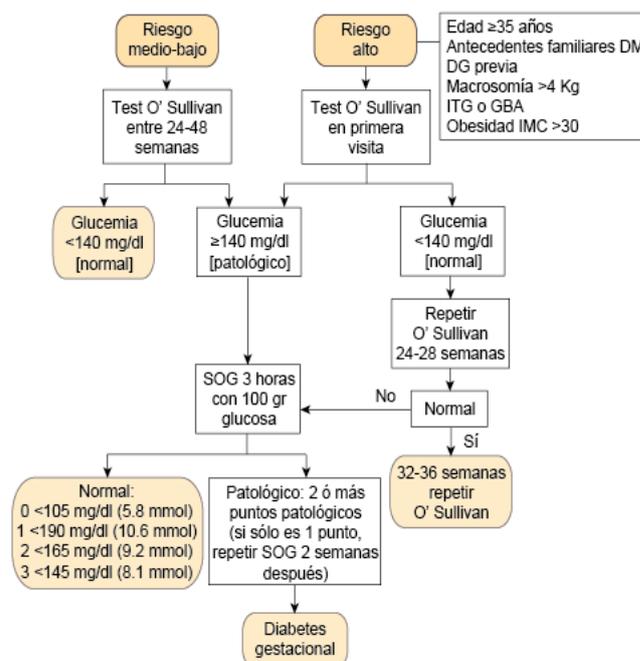


Figura 3. Algoritmo diagnóstico de diabetes gestacional.

Obtenido de: <https://www.fisterra.com/guias-clinicas/diabetes-gestacional/>

aunque dieran negativo presentan complicaciones típicas de DG.

Un resultado normal para la prueba de O'Sullivan (glucemia menor de 140mg/dL) descarta diabetes gestacional en pacientes embarazadas con riesgo bajo-moderado, situación que no es suficiente en gestantes con riesgo alto, donde será necesario repetir la prueba en el segundo y en el tercer trimestre.

Los resultados patológicos para la prueba de O'Sullivan deberán ser confirmados con una prueba de SOG, que se considera diagnóstico de diabetes gestacional si se obtienen dos o más puntos patológicos.

El manejo de esta enfermedad consiste en llevar una alimentación sana, realizar actividad física diaria y el tratamiento con insulina, o en su defecto, antidiabéticos orales como la metformina.

PREECLAMPSIA Y ECLAMPSIA

Trastorno hipertensivo del embarazo, definido como la aparición *de novo* de hipertensión arterial (HTA) (>140mmHg/90) y proteinuria (>300mg/24h) a partir de la semana 20 de gestación. Se distingue entre precoz (antes de semana 34, grave, principalmente debido a problema placentario) y tardía (después de semana 34, leve, principalmente por una alteración en el metabolismo de la glucosa de la madre).

Alrededor del 5% de las embarazadas experimenta una elevación rápida de la presión arterial durante los últimos meses del embarazo asociada a una gran pérdida de proteínas por la orina. La disminución de la presión oncótica origina que el agua acceda al compartimento vascular y aumente la presión sanguínea. Este proceso se llama

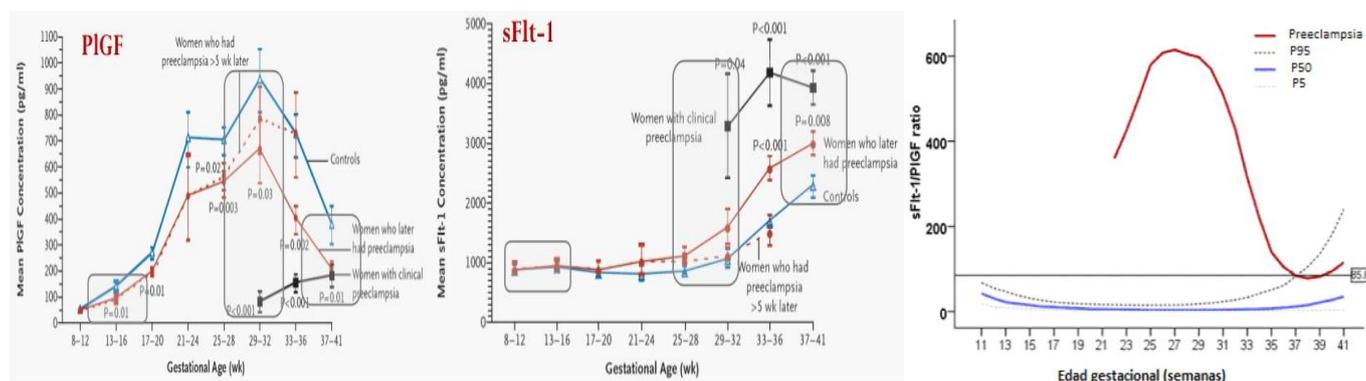


Figura 4. Evolución del PIGF, del sFlt1 y del cociente sFlt1/PIGF durante el embarazo normal y durante la preeclampsia. Obtenido de: Guyton et al., 2011 y Alcaine, M. J. et al., 2019

preeclampsia o toxemia del embarazo. Además, se produce una alteración funcional del endotelio vascular y un espasmo arterial en muchas regiones del cuerpo de la madre, que es más significativo en el cerebro, riñones e hígado. Descienden por tanto el flujo sanguíneo renal y el filtrado glomerular, lo cual es exactamente lo contrario de lo que sucede en el cuerpo de una embarazada normal.

Aunque la causa exacta es desconocida, se ha observado que en las embarazadas que desarrollan preeclampsia se produce un remodelado e invasión anormal de las arterias espirales maternas por el trofoblasto que conduce a una hipoperfusión placentaria y a una disfunción endotelial sistémica, en lugar de la vasodilatación propia del embarazo. Sin embargo, este fallo en la placentación no es suficiente para explicar la alteración endotelial que origina la enfermedad. Las manifestaciones clínicas de la alteración en el desarrollo trofoblástico aparecen posteriormente en la gestación, cuando los requerimientos nutricionales para el normal desarrollo del feto comienzan a superar la capacidad placentaria para suministrar la cantidad de flujo sanguíneo necesario ("modelo de dos etapas"). La placenta reacciona liberando a la circulación sustancias que serán las responsables de la disfunción endotelial sistémica materna durante la segunda mitad de la gestación.

En las embarazadas con preeclampsia aumenta la liberación de proteínas anti-angiogénicas tirosina kinasa I relacionada con fms soluble (sFlt1) y endogenina soluble (sEng), causantes de deterioro vascular, hipertensión, proteinuria, edemas, epigastralgia, hemorragias, ascitis, derrame pleural, así como anomalías renales y cardiovasculares. La evaluación de la gravedad del cuadro clínico es muy importante ya que la preeclampsia puede complicarse rápidamente dando lugar a un ictus, un síndrome de HELLP (del inglés H: hemólisis; EL: enzimas hepáticas elevadas; LP: bajo recuento plaquetario) o a una eclampsia, en la cual se desarrollan los mismos efectos que existen en la preeclampsia, pero con una intensidad extrema. Esta última se caracteriza por espasmo vascular extendido a todo el cuerpo, un estado generalizado de vasoconstricción, convulsiones clónicas maternas que a veces van seguidas de coma, gran disminución de la diuresis, fallo hepático, HTA de extraordinaria intensidad y un estado tóxico generalizado de todo el organismo.

Los factores maternos que predisponen a padecer este síndrome son: nuliparidad, preeclampsia previa, edad menor de 20 años o mayor de 40 años, IMC mayor o igual a 35, etnia afroamericana, técnicas de reproducción asistida, historia familiar, embarazo múltiple y enfermedades previas como HTA, enfermedad renal, la diabetes, lupus eritematoso sistémico (LES), y síndrome anti-fosfolípido (SAF), entre otros. Además, existe otro grupo de factores placentarios, también implicados en el desarrollo de la preeclampsia, que tiene su base en la disminución de la perfusión placentaria por causas inmunológicas (autoinmunidad NK mediada, anticuerpos), genéticas, factores ambientales, estrés oxidativo y factores nutricionales.

Durante el embarazo normal, los niveles séricos del factor de crecimiento placentario pro-angiogénico (PIGF) aumentan progresivamente durante el primer trimestre y, de forma más acusada, en el segundo, alcanzando su concentración máxima alrededor de la semana 29-32, para posteriormente disminuir. Por el contrario, las concentraciones de sFlt1, factor anti-angiogénico permanecen más o menos estables hasta las semanas 29-32 y luego aumentan rápidamente hasta el parto.

En gestantes que desarrollan preeclampsia se observan concentraciones de PIGF séricas significativamente más bajas desde el final del primer trimestre. El incremento de concentración de sFlt1 en gestantes que desarrollan preeclampsia, en cambio, no es notable durante el primer trimestre. De hecho, en este periodo el análisis de sFlt1 no resulta útil para la detección de embarazadas en riesgo de desarrollar preeclampsia (cribado). No obstante, a partir de la semana 29, el sFlt1 comienza a elevarse de modo más pronunciado. Las concentraciones séricas de sFlt1, y especialmente el índice, sFlt1/PIGF, posee por tanto un elevado valor diagnóstico para la disfunción placentaria y preeclampsia. El cociente se eleva en preeclampsia, alcanzando la máxima diferencia entre las semanas 26 y 31 (Figura 4).

Puesto que el proceso de placentación se completa hacia la semana 20 de gestación, los modelos de predicción de primer trimestre constituyen un verdadero cribado de preeclampsia. La obtención de modelos con mayor sensibilidad y especificidad se alcanza con la combinación de múltiples parámetros: factores maternos, clínicos,

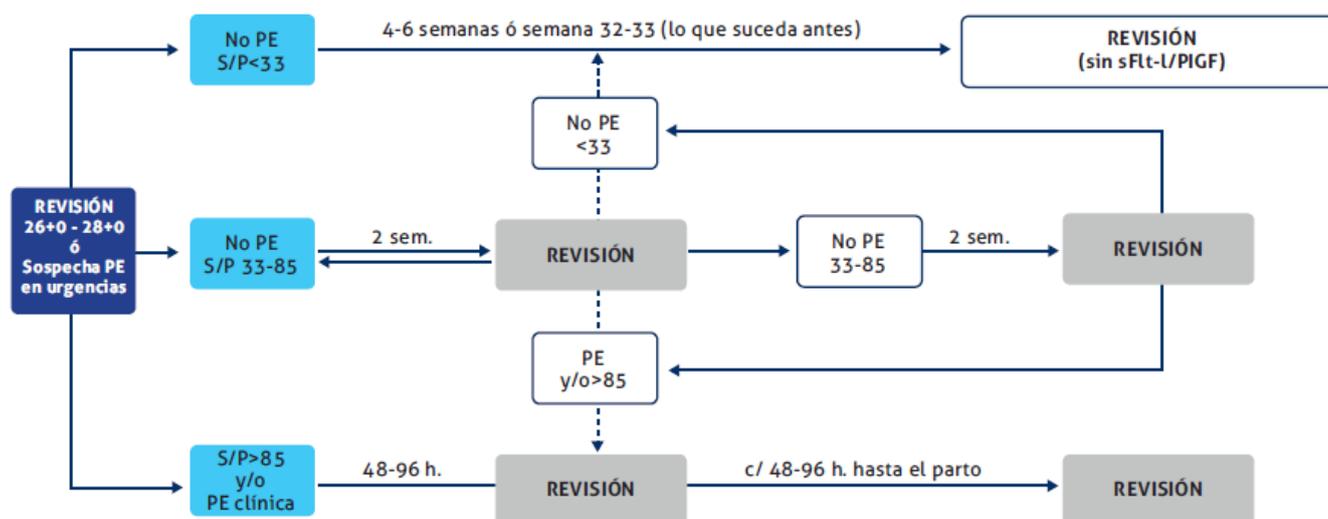


Figura 5. Algoritmo diagnóstico de preeclampsia durante el segundo y tercer trimestre. Obtenido de: Herráiz, I. et al., 2015

marcadores ecográficos Doppler y biomarcadores séricos, siendo el PIGF el más utilizado en el primer trimestre.

Debido a que en el segundo trimestre de gestación ya existe una placentación completa y podemos encontrar manifestaciones clínicas de la preeclampsia, la relación entre marcadores angiogénicos y antiangiogénicos tiene un papel importante en la predicción de preeclampsia y una relevancia clínica que aumenta su aplicabilidad, ya que el poder discriminatorio de sFlt1 es superior en esta etapa de la gestación. La relación entre sFlt1 y PIGF, expresada como cociente de sus concentraciones séricas, en combinación con marcadores ecográficos como el índice de pulsatilidad de arterias uterinas (UAPI) constituye un modelo de predicción de preeclampsia temprana que ha mejorado la sensibilidad y especificidad en el segundo trimestre.

El algoritmo diagnóstico empleado durante el segundo y tercer trimestres se representa en la Figura 5. Se evalúa el cociente sFlt-1/PIGF entre las semanas 26-28. Ratios inferiores a 33 descartan riesgo de preeclampsia. Ratios con valores entre 33 y 85 conllevan una revisión con nueva determinación de los biomarcadores tras 2 semanas. Por último, un ratio mayor de 85 requiere un manejo idéntico al de una preeclampsia con diagnóstico tradicional y reevaluaciones del cociente sFlt-1/PIGF cada 48-96 horas.

La determinación de biomarcadores PIGF y sFLT1 supone un gran valor añadido al diagnóstico clínico y tratamiento sintomático, mejorando el manejo del paciente. La administración rápida de fármacos vasodilatadores de acción rápida para reducir la presión arterial junto a la interrupción inmediata del embarazo consigue que la mortalidad sea del 1% o menor.

COLESTASIS INTRAHEPÁTICA GESTACIONAL

Colestasis reversible, específica de la gestación, que aparece en el tercer trimestre y que se resuelve espontáneamente tras el parto. Supone la hepatopatía más frecuente del embarazo (1%). Como en toda colestasis, existe una alteración del flujo biliar, con la consiguiente retención y paso a sangre de componentes de la bilis

(bilirrubina directa, sales biliares, colesterol, etc.), y que condiciona un cuadro clínico característico con aumento de bilirrubina a expensas de la directa, aumento de enzimas hepáticas, colesterol y triglicéridos, disminución del tiempo de protrombina y de la vitamina K y sobre todo aumento de ácidos biliares en suero (igual o superior a 10 $\mu\text{mol/L}$), marcador más precoz, sensible y específico de esta enfermedad. El trastorno se produce en la excreción de bilirrubina ya conjugada. Se debe complementar el diagnóstico de laboratorio con pruebas ecográficas, biopsia e histología. Si los resultados son normales, se deben repetir a las 1-2 semanas pues a veces el prurito precede a la alteración analítica.

Esta patología está asociada a factores genéticos (ABCB4, ABCB11), factores hormonales (estrógenos, progesterona) y factores ambientales (invierno, hiposelenemia). Los síntomas en la madre incluyen un prurito intenso, especialmente en las palmas de las manos y en las plantas de los pies, que aumenta de intensidad por las tardes y no responde a tratamiento con antihistamínicos, junto a coluria, hipocolia, ictericia, náuseas, esteatorrea e irritabilidad. Las complicaciones en el feto son más graves e incluyen el parto prematuro, la tinción del líquido amniótico con meconio y la morbimortalidad perinatal.

El tratamiento se realiza con ácido ursodesoxicólico. Debido al mayor riesgo de morbimortalidad fetal, no se recomienda extender los embarazos complicados con CIE más allá de la semana 37-38 en casos de sintomatología intratable y/o elevación de los ácidos biliares por encima de 40 micromol/L. Sin tratamiento, la mortalidad del feto puede llegar hasta el 20%.

MONITORIZACIÓN DEL RECIÉN NACIDO

- Ictericia neonatal

En ictericia neonatal hay una elevación de la bilirrubina total a expensas de la indirecta o no conjugada, que se encuentra unida a albúmina o en formas libres, las cuales pueden atravesar la barrera hematoencefálica y producir daño por

acúmulo en el cerebro del recién nacido (Kernicterus o encefalopatía bilirrubínica) e incluso la muerte. Las causas más importantes de ictericia neonatal son la eritroblastosis fetal en relación con la incompatibilidad del factor Rh entre el feto y la madre (EHRN) o el déficit fisiológico de actividad enzimática uridinadifosfato glucuroniltransferasa, enzima hepática que cataliza la transformación de bilirrubina indirecta en bilirrubina directa que es escasa durante la primera semana de vida. El tratamiento de elección es la fototerapia.

- Madurez pulmonar

Se evalúa mediante el estudio del surfactante pulmonar. Se considera indicativo de madurez pulmonar un índice lecitina/esfingomielina (L/E) de 2:1 a las 35 semanas.

- *Streptococcus agalactiae*

Principal agente etiológico de sepsis neonatal temprana. Se realiza un cultivo a las madres durante las últimas semanas de gestación. En caso necesario se administrará profilaxis antibiótica intraparto.

- Test de Apgar

La puntuación de Apgar es una prueba para evaluar a recién nacidos poco después de su nacimiento. Se evalúa la coloración de la piel, la frecuencia cardíaca, la irritabilidad o respuesta refleja, el tono muscular y la respiración del neonato para determinar si necesita ayuda médica adicional o de emergencia. Una puntuación de 7/10 o superior se considera satisfactoria.

- Prueba del talón

A nivel nacional se estudian 7 alteraciones metabólicas congénitas que constituyen enfermedades raras cuyo diagnóstico inmediato puede prevenir secuelas futuras. Forman parte del sistema de detección precoz o cribado neonatal la fibrosis quística, la fenilcetonuria, el hipotiroidismo congénito, la aciduria glutárica tipo 1, el déficit de β -oxidación de ácidos grasos de cadena media (MCADD), el déficit de β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga (LCADD) y la anemia falciforme.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Alcaine MA. Utilidad de los marcadores bioquímicos de preeclampsia. Rev Lab Clin. 2019;12(3):9-24.
- Carlson BM. Embriología humana y biología del desarrollo. 6ª ed. Barcelona: Elsevier; 2020.
- Cunningham FG, et al. Obstetricia de Williams. 23ª ed. McGraw-Hill; 2011.
- González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 2ª ed. Barcelona: Elsevier España; 2014.
- Guyton y Hall. Tratado de Fisiología médica. 12ª Ed. Barcelona: Elsevier Saunders; 2011
- Herraiz García I, López Jiménez AE, Gómez Arriaga PI, Escribano Abad D, Galindo Izquierdo A. Doppler de arterias uterinas y marcadores angiogénicos (sFlt-1/PIGF): futuras implicaciones para la predicción y el

diagnóstico de la preeclampsia. Diagn Prenat. 2011;22(2):32-40.

- Moore KL, et al. Embriología clínica. 11ª ed. Barcelona: Elsevier; 2020.
- Pérez Arellano JL. Manual de Patología General. 6ª ed. Barcelona: Elsevier Masson; 2011.
- Sadler TW. Langman. Embriología médica. 13ª ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.

MONITORIZACIÓN DE FÁRMACOS EN EL LABORATORIO DE URGENCIAS

Autores: Fernando Calvo Boyero¹, Cristian Rosas Espinoza², Cecilia Cueto-Felgueroso Ojeda¹

¹Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de octubre

²Servicio de Farmacia Hospitalaria, Hospital Universitario 12 de octubre

Palabras clave: Monitorización, Fármacos, Urgencias

INTRODUCCIÓN

La monitorización de fármacos consiste en el uso de distintas mediciones de la concentración de un fármaco en los líquidos corporales como ayuda para optimizar la farmacoterapia destinada a la cura, el alivio o la prevención de enfermedades. Se reserva exclusivamente a aquellos con margen terapéutico estrecho, es decir, a aquellos en los que su concentración mínima eficaz está cerca de su concentración tóxica.

Estos fármacos, además, deben tener una relación clara entre su concentración y sus efectos terapéuticos y adversos, de otra forma la monitorización de concentraciones resultaría ineficaz. Además, los efectos farmacológicos deben ser difícilmente evaluables. Por ejemplo, en el caso del Sintrom® (Acenocumarol), sus efectos se monitorizan eficazmente mediante el Tiempo de Protrombina o el INR, por lo que la monitorización de sus concentraciones resulta innecesaria.

Por otra parte, la monitorización es necesaria y eficaz en aquellos fármacos que se usan de forma profiláctica (como los antiepilépticos), aquellos con efectos adversos semejantes a la enfermedad (como la digoxina) y aquellos con una escasa relación entre la dosis y la concentración, debido a su variabilidad farmacocinética, farmacogenética y a sus interacciones con alimentos o con otros medicamentos.

Como ejemplo, en este estudio¹ se puede observar que, al administrar la misma dosis de fenitoína en 200 pacientes ambulatorios adultos, la concentración obtenida es ampliamente variable. Solamente el 60% de los pacientes presentan concentraciones dentro del margen terapéutico establecido (Figura 1).

FARMACOCINÉTICA

Cuando un fármaco es administrado, sufre diferentes procesos en el organismo conocidos por el acrónimo LADME:

- Liberación: Constituye la salida del fármaco de la forma farmacéutica (comprimidos, cápsulas, etc.) que lo transporta y su disolución y difusión en los fluidos corporales.
- Absorción: Es el paso del principio activo al torrente sanguíneo.
- Distribución: Llegada y disposición de un fármaco a los diferentes tejidos de un organismo.

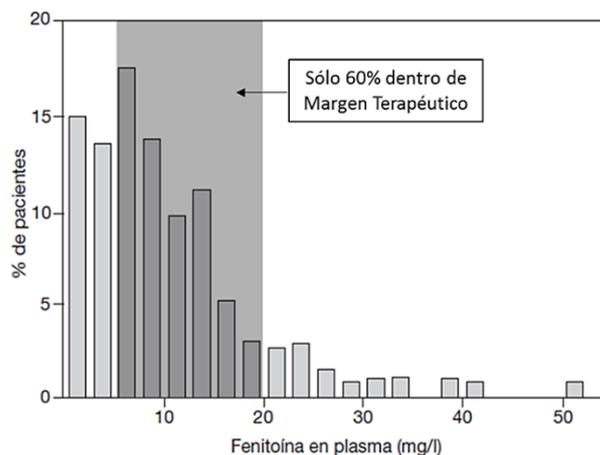


Figura 1. Frecuencia de distribución de las concentraciones de fenitoína en pacientes ambulatorios tratados con la misma dosis. Adaptado de Hallworth M, 2017

- Metabolismo: Transformación de los fármacos a sustancias más hidrosolubles que sean fácilmente excretadas del organismo.
- Excreción: Eliminación del fármaco o sus metabolitos del organismo, principalmente por vías renal y hepática.

Hay que destacar que las formas farmacéuticas intravenosas no sufren los procesos de liberación y absorción, ya que se administran directamente en el torrente sanguíneo. Durante el transcurso de LADME, el principio activo pasa por diferentes situaciones, como un efecto de metabolismo previo a la distribución (efecto de primer paso hepático), unión a proteínas plasmáticas, distribución a tejidos periféricos o circulación enterohepática. Estos procesos se resumen en la Figura 2.

FACTORES RELACIONADOS CON LA VARIABILIDAD

Existen numerosos factores que pueden modificar la concentración del fármaco en el organismo.

Factores relacionados con el paciente:

- Edad: La edad condiciona el estado hepático y renal y la concentración de proteínas plasmáticas de unión al fármaco (albúmina, α -glucoproteína), entre otros factores. En general, la velocidad relativa de metabolismo de fármacos es: Niños > Adultos > Ancianos > Neonatos.

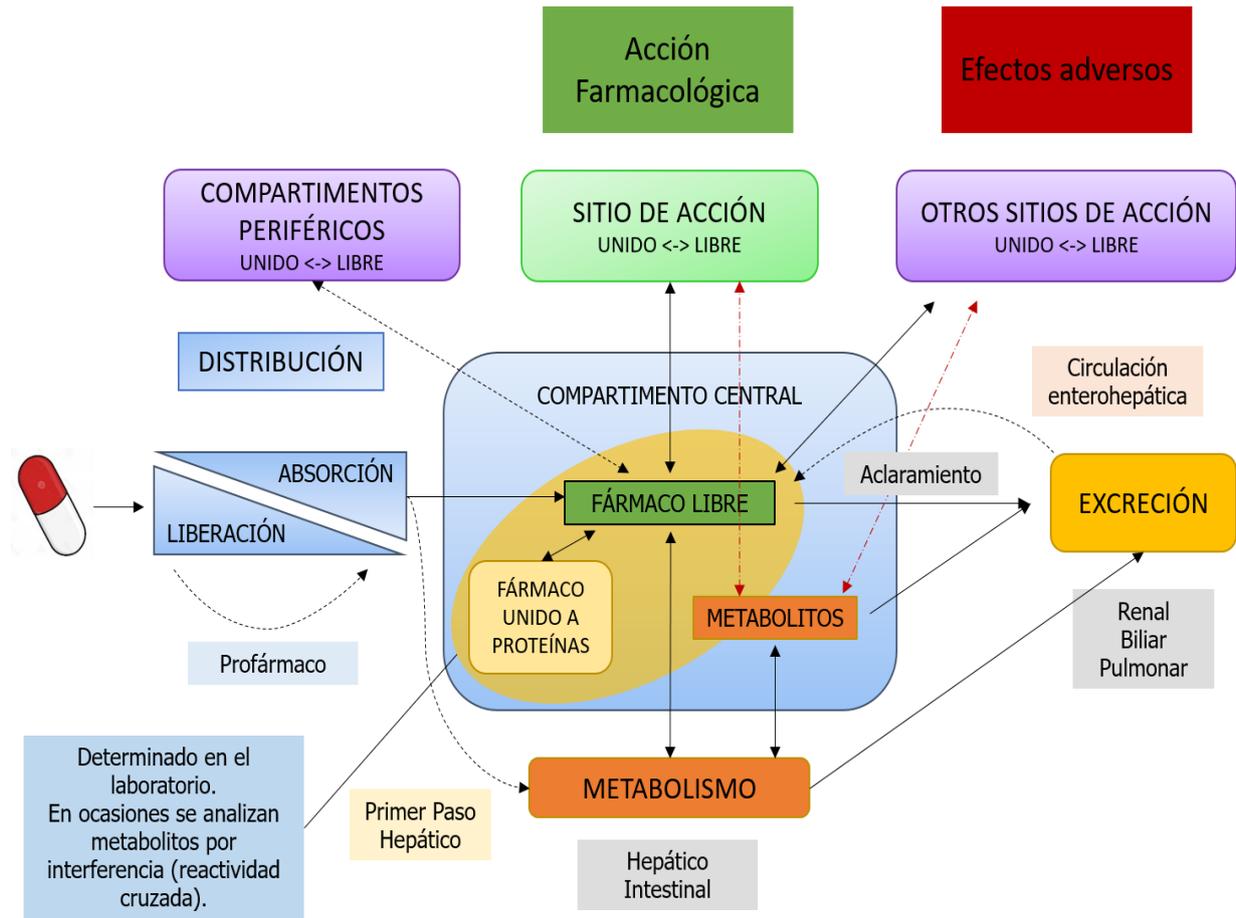


Figura 2. Procesos que sufre un fármaco en el organismo. Elaboración propia

- Farmacogenética: Existen numerosas variantes genéticas (polimorfismos) que pueden condicionar una alta, baja o nula actividad en proteínas metabolizadoras (Citocromo CYP450), proteínas transportadoras, etc.
- Peso: El sobrepeso y la obesidad conllevan mayor volumen de distribución de fármacos liposolubles y, por tanto, menor concentración plasmática.
- Enfermedad renal, cardíaca o hepática: Condicionan los procesos de distribución, metabolismo y excreción de fármacos.
- Embarazo: Se produce una disminución de la unión a proteínas plasmáticas, así como un aumento de la filtración glomerular y una inducción enzimática debido al aumento de la progesterona².

Hay que tener en cuenta que únicamente la fracción libre de fármaco se distribuye y ejerce su acción farmacológica, por lo que la variación en la unión a proteínas plasmáticas en aquellos fármacos que se unen en >90% va a condicionar sus efectos terapéuticos y tóxicos.

Las principales condiciones fisiopatológicas que reducen la concentración de albúmina, incrementándose así la fracción de fármaco libre son:

- Enfermedad hepática y renal
- Embarazo e Hipertiroidismo
- Malnutrición

- Traumatismo, incluyendo quemaduras
- Edad > 75 años
- Infección por VIH
- Interacciones entre fármacos

Un ejemplo claro lo encontramos en la fenitoína. Esta se une a la albúmina en un 90%, por lo que, en condiciones normales, es el 10% del fármaco que se encuentra libre en el torrente sanguíneo el responsable de ejercer su efecto farmacológico. En cambio, en un paciente con hipoalbuminemia severa, la unión es de un 60% y la fracción libre aumenta, alcanzándose concentraciones de fármaco libre cuatro veces superiores. En estos casos se debe utilizar un rango terapéutico de 2,5-5 µg/mL en lugar del rango habitual de 10-20 µg/mL para calcular la dosis de carga y de mantenimiento.

FACTORES PREANALÍTICOS

- Espécimen requerido

Es necesario un espécimen adecuado para la monitorización efectiva. Normalmente se utilizan muestras de suero o plasma indistintamente. En el caso del Litio, es importante utilizar heparina sódica o suero, para evitar la interferencia por la heparina de litio. En el caso de los inmunosupresores, se prefiere el uso de sangre total, ya que los fármacos se distribuyen en el interior de los hematíes.

- Extracción de muestra

La obtención de la muestra debe hacerse una vez alcanzado el estado de equilibrio estacionario (a partir de 5-7 semividas de eliminación del fármaco). En caso de sospechar una toxicidad temprana o en caso de fármacos con alta semivida (como el fenobarbital, con una semivida de eliminación de 100 horas), se puede determinar a partir de 3-4 semividas.

El mejor momento de extracción es en la C_{min} (concentración en valle) del compuesto, es decir, al final del intervalo posológico, justo antes de la siguiente dosis. Este es un parámetro que correlaciona bien con del Área Bajo la Curva (AUC), que determina la exposición del fármaco en el organismo. En fármacos con larga semivida de eliminación (mayor de 24 horas), el tiempo de muestreo es menos crítico. Por ejemplo, en la digoxina ($t_{1/2}$: 36-48h), se puede determinar la concentración a partir de 8 horas desde la última dosis, y es necesario evitar el ejercicio, ya que reduce su concentración.

En algunos compuestos, se puede determinar la C_{max} (concentración en pico) para valorar los efectos tóxicos. Por ejemplo, en los antibióticos se puede determinar la C_{max} a los 30-60 minutos de la administración. Hay que recordar que el rango terapéutico de la determinación en pico es diferente al de la determinación en valle.

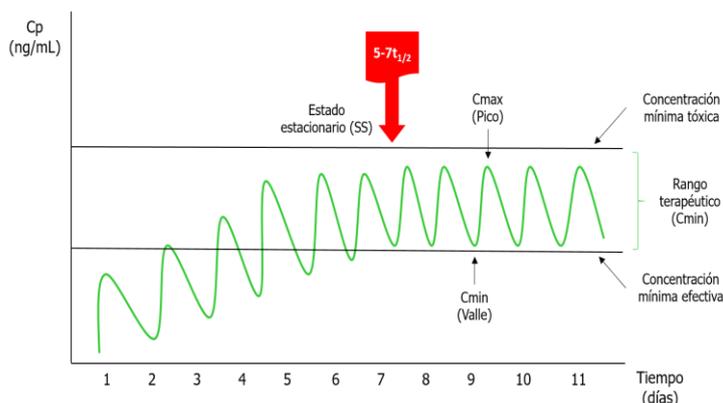


Figura 3. Curva de concentraciones plasmáticas de un fármaco. C_p : Concentración plasmática. Elaboración propia

- Interacciones

Los fármacos pueden interactuar dentro del organismo con otras moléculas que hacen que se modifique su concentración plasmática (interacción farmacocinética) o su efecto farmacológico (interacción farmacodinámica). Las más comunes son las interacciones farmacológicas (entre fármacos), aunque también existen interacciones con alimentos, productos de herbolario y tóxicos (alcohol y tabaco).

Las interacciones entre fármacos principalmente están asociadas con el desplazamiento de la unión a las proteínas plasmáticas o con la inducción o inhibición de las enzimas microsomales hepáticas (Ej. Citocromo CYP450). Un ejemplo de inhibidores e inductores se encuentra en la Tabla 1.

Inhibidores del CYP3A4	Inductores del CYP3A4
Antibióticos (Eritromicina, Claritromicina, Metronidazol)	Antiepilépticos (Fenobarbital, Carbamazepina, Fenitoína, Etosuximida, Primidona)
Antifúngicos (Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol)	Antituberculosos (Rifampina, Isoniazida)
Inhibidores de proteasa de VIH-1 (Ritonavir, Saquinavir, Indinavir, Nelfinavir)	Otros (Dexametasona, Griseofulvina, Hierba de San Juan)
Bloqueantes de canales del calcio (Diltiazem, Nifedipino, Verapamilo)	
Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (Fluoxetina, Paroxetina, Fluvoxamina, Sertralina)	
Otros (Antiprogéstágenos, Amiodarona, Cimetidina, Imatinib, Interferón γ , Tacrolimus)	Cannabinoides, Zumo de pomelo, Quinina

Tabla 1. Inhibidores e inductores del CYP3A4 (en negrita se señalan los inhibidores potentes). Adaptado de: Saphiro J, 2002

Existen varios alimentos que pueden influenciar la actividad de los fármacos por diferentes mecanismos. Entre ellos, los inhibidores de CYP450, como el zumo de pomelo, o el consumo de alimentos ricos en vitamina K en pacientes tratados con acenocumarol.

La ingesta de alcohol de forma aguda produce inhibición del CYP450, mientras que la ingesta crónica de alcohol o el consumo de tabaco, producen inducción enzimática.

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

- Métodos

Existen diferentes técnicas para la determinación de fármacos en los equipos automatizados de urgencia. En nuestro caso, el Salicilato y el Acetaminofeno se determinan mediante métodos enzimáticos colorimétricos:



Acetaminofeno + Arilacilamidasa → p-Aminofenol + Acetato
p-Aminofenol + o-Cresol + Peryodato → Indofenol

Otros fármacos como la Teofilina, Fenobarbital, Carbamazepina o Fenitoína se determinan en nuestro hospital mediante interacción cinética de micropartículas en solución (KIMS). En esta técnica, el fármaco compete con un conjugado del mismo por los sitios de unión del anticuerpo unido a micropartículas, midiendo la aglutinación de esta unión por aumento de la absorbancia.

El Valproato y el Metrotrexato son determinados mediante inmunoensayo homogéneo multiplicado por enzimas (EMIT), donde el fármaco compete con el fármaco marcado con G6PDH. Esta unión inhibe la actividad enzimática, por lo que a mayor cantidad de fármaco habrá una mayor actividad enzimática, que se determina por el incremento de NADH y, por tanto, por el aumento de absorbancia a 340 nm.

La Digoxina, que es activa a concentraciones muy bajas, se determina mediante Electroquimioluminiscencia (ECLIA). Durante la primera incubación, el fármaco se combina con un anticuerpo específico marcado con rutenio. Posteriormente, se añaden micropartículas recubiertas de estreptavidina junto a un derivado de digoxina marcado con biotina, que se une a los anticuerpos que quedan libres. Tras una segunda incubación, se forman complejos entre el derivado de digoxina y las micropartículas, por la unión entre la biotina-estreptavidina. Se capturan estas micropartículas por magnetismo y aplicando un voltaje se induce la quimioluminiscencia, que será inversamente proporcional a la concentración de digoxina.

- Interferencias

Las interferencias en la determinación de fármacos dependen principalmente del método utilizado.

Algunos ejemplos: Existen interferencias debidas a componentes endógenos, como falsos positivos de acetaminofeno (paracetamol) en muestras con hiperbilirrubinemia; también podemos encontrarnos con anticuerpos heterófilos (capaces de unirse a otras inmunoglobulinas, como las utilizadas en inmunoensayos) o sustancias inmunorreactivas similares a la digoxina (DLIS) que pueden dar resultados falsamente elevados en la determinación de digoxina.

FÁRMACOS URGENTES

La principal indicación de la monitorización de fármacos de forma urgente es la sospecha de toxicidad o intoxicación aguda debida al fármaco para confirmar o descartar su implicación y decidir qué medidas adoptar (cambio de dosis, suspensión, hemodiálisis, etc.).

Además, la monitorización es útil en presencia de fracaso terapéutico, para descartar si esta situación se debe a infradosificación, interacciones, incumplimiento, alteraciones farmacocinéticas o alteraciones fisiopatológicas (Insuficiencia renal, hepática o cardíaca).

- Paracetamol

El paracetamol o acetaminofeno es un fármaco analgésico y antipirético cuyo uso está muy extendido. Esta accesibilidad

unida a su toxicidad a dosis altas hace que en ocasiones sea utilizado en intentos autolíticos. Es importante su monitorización precoz, ya que el tratamiento antes de las 16 horas post-ingesta con N-acetilcisteína reduce la hepatotoxicidad y la mortalidad.

En adultos, la vía de metabolización principal es la glucuronización (90%), mientras que en niños es la sulfatación. Un 5% del paracetamol se elimina directamente por vía renal, mientras que el 5% restante es convertido en metabolito activo por el sistema de oxidación del citocromo P450 hepático, dando lugar a la N-acetil-para-benzoquinoneimina (NAPBQ), producto responsable de su toxicidad.

A dosis terapéuticas este metabolito se elimina mediante conjugación con glutatión reducido. Sin embargo, en intoxicaciones disminuyen hasta en un 70% los depósitos de glutatión y los hepatocitos quedan muy expuestos a sufrir lesiones oxidativas, produciéndose enlaces covalentes entre el tóxico y las proteínas de la célula, ocasionando finalmente necrosis hepatocelular.

La intoxicación en ausencia de tratamiento consta de varias fases:

- Fase Latente (0-24h post-ingesta): Paciente asintomático o con epigastralgia, náuseas y vómitos. Es signo de mal pronóstico el dolor espontáneo en hipocondrio derecho y la trombocitopenia.
- Fase Hepática (24-48h post-ingesta): Se observa un aumento de transaminasas, aumento del Tiempo de protrombina (TP) y disminución de Antitrombina III (ATIII). Es posible la aparición de ictericia por inicio de colestasis. Descensos del TP inferiores al 20% y refractarios al uso de la vitamina K se consideran de mal pronóstico.
- Fase Fracaso Multiorgánico (48-96h post-ingesta): Insuficiencia hepática (cambios histológicos en zona III, centrolobulillar), encefalopatía, hipoglucemia y coagulopatía. Insuficiencia renal aguda por necrosis tubular.
- Fase Final: Coma hepático y shock si no se realiza trasplante hepático.

Las dosis tóxicas de paracetamol son de 140 mg/Kg en niños, 125 mg/Kg en adultos sin factores de riesgo, y 100 mg/Kg en adultos que si presentan factores de riesgo (alcoholismo crónico, enfermedad hepática, desnutrición e inducción enzimática).

Para la evaluación del riesgo y la administración del antídoto en caso de conocer la hora de la ingesta se utiliza el Nomograma de Rumack-Matthew, que tiene validez entre las 4 y las 24 horas post-ingesta. La determinación de concentración de fármaco en sangre antes de las 4 horas no es valorable, ya que no han terminado los procesos de absorción y distribución. Este nomograma indica, utilizando los niveles de paracetamol y las horas transcurridas tras la ingesta, si el paciente se encuentra en riesgo de toxicidad hepática o no. Existen dos variantes, que usan diferentes puntos de corte, en función de pacientes normales (Rumack 150) o con factores de riesgo (Rumack 100).

En caso de no conocer la hora de la ingesta, se puede valorar la semivida de eliminación del tóxico como un índice pronóstico de hepatotoxicidad. Para esto se realizan dos determinaciones de paracetamol separadas en 2 horas (T0 y T2). Pueden darse varias situaciones³:

- Si $T2 \geq T0$, aún no se ha completado la absorción.
- Si cociente $T0/T2 < 1,4$ la semivida de eliminación es > 4 horas, por lo que existe alto riesgo de toxicidad hepática.
- Si cociente $T0/T2 > 1,4$ la semivida de eliminación es < 4 horas, por lo que existe bajo riesgo de toxicidad hepática.

- Salicilatos

Propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. A dosis terapéuticas, el pico plasmático se alcanza a las 1-2 horas, con alta unión a proteínas plasmáticas (80-90%). En sobredosis o intoxicación, la concentración máxima no se logra hasta las 4-6 horas o incluso hasta las 12 horas o más, además de disminuirse la unión a proteínas plasmáticas por saturación, aumentando con ello la fracción libre (activa). La principal vía de metabolización es hepática (conjugación con glicina y glucurónico). La concentración terapéutica es de 10-30 mg/dL.

Dosis tóxica:

- 150 mg/kg de peso: intoxicación leve.
- Entre 150 y 300 mg/kg: intoxicación moderada.
- Superior a 300 mg/kg: intoxicación grave.
- Toxicidad significativa en el adulto tras una ingesta de 16-18 gramos de aspirina en una toma única.

Una salicilemia alrededor de 40 mg/dL es orientativa de una intoxicación leve; mientras que valores superiores a 50 mg/dL son graves o muy graves y mayor de 100 mg/dL es potencialmente mortal. La concentración determinada confirma el diagnóstico, pero no se correlaciona de forma precisa con la toxicidad (cambios en el pH afectan a la distribución de los salicilatos). El tratamiento en urgencias se basa en medidas específicas de descontaminación digestiva y alcalinización de la orina, además de corrección de las alteraciones electrolíticas y rehidratación.

El Nomograma de Done correlaciona la toxicidad clínica con los niveles séricos de salicilato y tiempo desde la ingesta. Ha de usarse con niveles plasmáticos extraídos a partir de las 6 horas desde la ingesta y sólo es útil en casos de intoxicaciones únicas y agudas, sin ingestiones asociadas.

- Antiepilépticos:

Las recomendaciones terapéuticas deben hacerse teniendo en cuenta tanto las concentraciones séricas como las manifestaciones clínicas. Si hay control clínico, no se deben hacer modificaciones de dosis, aunque estén por debajo de los intervalos establecidos. En cuanto al rango terapéutico, existe mayor evidencia para los antiepilépticos tradicionales. Los estudios de antiepilépticos realizados en niños muestran un comportamiento farmacocinético diferente respecto al observado en adultos.

- Carbamazepina: El rango terapéutico es de 4-12 $\mu\text{g/mL}$. Se alcanza el estado estacionario tras 2-4 semanas

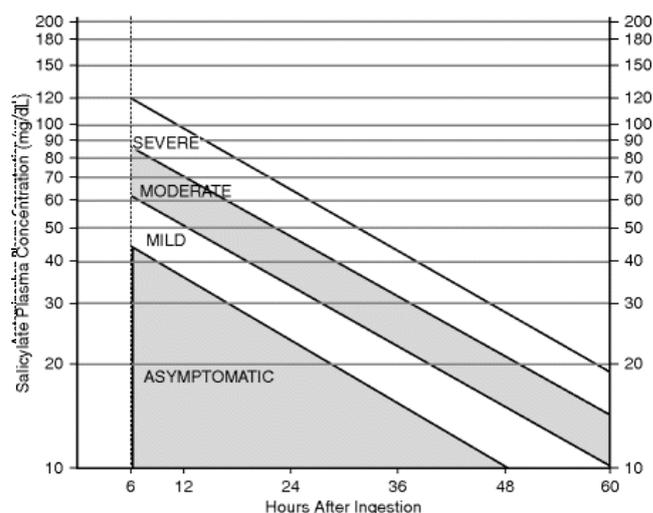


Figura 5. Nomograma de Done. Obtenido de: Varon J, 2016

desde el inicio de tratamiento (1 semana si cambio de dosis).

- Fenitoína: El rango terapéutico es de 10-20 $\mu\text{g/mL}$. Se alcanza el estado estacionario tras 1-2 semanas desde el inicio de tratamiento (2-4 semanas si cambio de dosis). La fenitoína tiene un elevado porcentaje de unión con la albúmina sérica (90%). Las situaciones de hipoalbuminemia (cirrosis hepática, embarazo, paciente crítico) obligan a corregir la concentración total de fenitoína.
- Fenobarbital: El rango terapéutico es de 15-40 $\mu\text{g/mL}$. Se alcanza el estado estacionario tras 17-25 días desde el inicio de tratamiento. La dosis tóxica es de 5 gramos. Baja correlación entre la concentración del fármaco y el efecto terapéutico.
- Valproato: El rango terapéutico como antiepiléptico es de 50-100 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en el trastorno bipolar es de 50-125 $\mu\text{g/mL}$. Se alcanza el estado estacionario tras 4-5 días desde el inicio de tratamiento. Existe una interacción clínicamente relevante con los antibióticos carbapenémicos, por la cual aumenta la eliminación de valproato hasta niveles infraterapéuticos (llegando incluso a ser una eliminación total). Se insta a administrar una dosis de carbapenémico, sin que responda a aumentos de dosis de valproato. Se revierte a las 24-48 horas tras suspensión del antibiótico.

La toxicidad asociada a la sobredosificación de estos fármacos cursa fundamentalmente con clínica neurológica (nistagmo, ataxia, disartria, etc.). Incluso puede desencadenar ataques de porfiria (fenobarbital). También se han descrito casos de toxicidad hematológica (anemia megaloblástica). En el caso concreto de valproato, puede darse también toxicidad a nivel hepático y producir pancreatitis.

- Teofilina

La teofilina es un broncodilatador utilizado en el tratamiento de EPOC. Puede producir toxicidad neurológica y cardiovascular. Su rango terapéutico es de 10 a 20 $\mu\text{g/mL}$, y el tiempo en alcanzar el estado de equilibrio es de 3 a 5 días.

Por encima de 20 µg/ml prácticamente ya no aumenta la acción broncodilatadora, pero sí los efectos tóxicos principalmente cardíacos y nerviosos.

El principal motivo para monitorizar la teofilina es que su aclaramiento difiere enormemente de un individuo a otro. En pacientes con sobrepeso, hepatopatía o dietas y en recién nacidos prematuros existe una eliminación más lenta, mientras que en fumadores se observa una rápida eliminación.

- Litio

El litio se utiliza principalmente para el tratamiento del trastorno bipolar, como estabilizante del ánimo. Es un fármaco con un margen terapéutico muy estrecho de 0,40 a 1,0 mmol/L (hasta 1,2 mmol/L en la fase aguda del trastorno bipolar), con importantes interacciones y gran variabilidad interindividual. Por todo ello resulta fundamental su monitorización.

La intoxicación más común es de forma crónica por acumulación, destacando la toxicidad renal y tiroidea.

- Digoxina

Se utiliza como antiarrítmico y para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Actúa inhibiendo la bomba ATPasa de sodio-potasio.

El rango terapéutico es especialmente estrecho, siendo de 0,8-2 ng/mL como antiarrítmico y de 0,5-1 ng/mL en insuficiencia cardíaca. Debe tomarse una muestra de sangre al menos 6 horas después de la dosis para permitir la distribución y garantizar que las concentraciones plasmáticas reflejan la concentración tisular.

La intoxicación con digoxina provoca síntomas a nivel digestivo, neurológico y cardíaco (bradicardia sinusal, aplanamiento de la onda T del electrocardiograma). Se deben vigilar estrechamente los niveles de potasio, ya que en situación de hipopotasemia aumenta la afinidad de digoxina por su lugar de acción.

- Metotrexato

Aunque tiene indicación en patología reumática como inmunomodulador, el gran interés de su monitorización recae sobre su uso como antineoplásico al utilizarse grandes dosis en este escenario. Es un inhibidor competitivo de la dihidrofolato reductasa.

Presenta eliminación trifásica: distribución, eliminación renal, eliminación a partir de la distribución intracelular. El intervalo objetivo es conseguir concentraciones <0,5-1 µmol/L (<225-450 µg/L) 48 horas después del tratamiento con dosis altas o según el protocolo del centro.

Las dosis de metotrexato se ajustan en base a los niveles de MTX obtenidos a las 24, 48 y 72 horas. Los niveles que sobrepasen los 50 µmol/L a las 24 horas, los 10 µmol/L a las 48 horas y los 0,5 µmol/L a las 72 horas indican una potencial toxicidad y se suele realizar un rescate de leucovorin (folinato de calcio) según los algoritmos de cada hospital hasta que el nivel de MTX sea <0,05 µmol/L⁵.

- Inmunosupresores

Los fármacos inmunosupresores constituyen la base tanto de la quimioprofilaxis como del tratamiento del rechazo de un órgano trasplantado. No actúan de forma selectiva sobre una citoquina o receptor, sino que intervienen en una serie de pasos de la cascada inflamatoria y respuesta inmune. La importancia de su monitorización radica en la necesidad de generar una depresión del sistema inmune suficiente para evitar el rechazo, pero que a su vez lo mantenga activo para poder combatir los distintos patógenos a los que está expuesto el individuo. Existen diferentes mecanismos de acción, pero los que más se utilizan son los inhibidores de la vía de la calcineurina: tacrolimus y ciclosporina. Presentan elevada unión a proteínas plasmáticas. Dado que el fármaco se concentra en los hematíes, la muestra deberá ser de sangre completa y no suero o plasma.

El intervalo objetivo varía ampliamente con el momento de muestreo, el tipo de trasplante y el tiempo después del trasplante (inducción, dentro de los 3 primeros meses habitualmente, o mantenimiento)

1. Tacrolimus: Puede causar nefrotoxicidad, toxicidad hematológica, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. El intervalo objetivo varía con el tipo de trasplante, siendo en el trasplante renal donde más se utiliza (8-12 ng/mL en la terapia de inducción, reduciéndose en el mantenimiento a 5-10 ng/mL).
2. Ciclosporina: Puede causar disfunción renal como efecto adverso grave, además de hipertensión e hiperlipidemia. Los momentos de muestreo recomendados son en la concentración mínima o 2 horas después de la dosis. Los intervalos terapéuticos más utilizados son los siguientes⁶:
 - Riñón, hígado:
 - Terapia de inducción: 150-250 ng/mL.
 - Terapia de mantenimiento: 100-200 ng/mL.
 - Corazón:
 - Terapia de inducción: 250-350 ng/mL.
 - Terapia de mantenimiento: 150-250 ng/mL.
 - Trasplante cardiopulmonar:
 - Terapia de inducción: 350-600 ng/mL.
 - Terapia de mantenimiento: 200-300 ng/mL.
 - Trasplante de médula: 100-350 ng/mL.

- Antibióticos:

Tendrá sentido la monitorización de antibióticos para asegurarnos que no sobrepasamos el límite de toxicidad y que tenemos concentración sérica suficiente para que puedan ejercer su acción. De esta forma se usarán de forma segura y efectiva, disminuyendo el riesgo de aparición de resistencias bacterianas por exposición a niveles bajos y mantenidos de antibiótico. Principalmente se monitorizan vancomicina (glucopéptido) y amikacina (aminoglucósido). Se debe determinar la concentración máxima tras 1 hora desde la administración de la dosis y la concentración mínima justo antes de la siguiente dosis.

- Vancomicina: Antibiótico con actividad frente a cocos Gram positivos. Se puede administrar por vía oral para el tratamiento de *Clostridioidea difficile*, pero por esta vía carece de absorción sistémica. Por lo tanto, solo interesará monitorizar su administración intravenosa. Baja unión a proteínas plasmáticas. Destaca su nefrotoxicidad cuando se usa a dosis altas. Los intervalos objetivos serán de 30-40 µg/mL para la Cmax (solo de interés en tratamiento con dosis altas de infecciones del sistema nervioso central, endocarditis u osteomielitis) y 10-15 µg/mL para la Cmin (pueden llegar hasta 15-20 µg/mL si se trata de endocarditis)⁷.
- Amikacina: Antibiótico de amplio espectro, utilizado fundamentalmente para tratamiento de bacilos Gram negativos. Dada sus características farmacocinéticas, habitualmente se utiliza en dosis única. Pero es posible que se desee un tratamiento mantenido, sobre todo en neonatos, a dosis más bajas. Presentan una muy baja unión a proteínas plasmáticas. Destaca su toxicidad renal y auditiva. En administración única diaria, el objetivo es conseguir Cmin de <5 µg/mL (no es necesario determinar la Cmax). En el caso de dosis múltiples, el objetivo será obtener Cmin <10 µg/mL, y una Cmax de 20-30 µg/mL.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Koch-Weser J. Serum drug concentrations in clinical perspective. In: Richens A, Marks V, eds. Ther Drug Monit. Edinburgh: Churchill, Livingstone; 1981. p. 1-22.
2. Vera O. Uso de fármacos en el embarazo. Rev Med La Paz [Internet]. 2015;21(2):60-66. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-89582015000200010
3. Encina Y. Intoxicación por paracetamol. En: Pinillos MA, coord. Libro electrónico de temas de urgencia. Pamplona: Servicio Navarro de Salud; 2008. Disponible en: <http://www.navarra.es/appsext/DescargarFichero/default.aspx?codigoAcceso=PortalDeSalud&fichero=Toxicologia%5CParacetamol.pdf>
4. Varon J. Toxicology. En: Handbook of Critical and Intensive Care Medicine. Springer, Cham; 2016. p. 375-95.
5. ARK Diagnostics. ARK Methotrexate Assay. Fremont, CA: ARK Diagnostics; 2017. Disponible en: https://www.ark-tdm.com/products/cancer/methotrexate/pdfs/ARK_Methotrexate_Assay_Rev07_August_2017.pdf
6. Hallworth M, Watson I. Therapeutic Drug Monitoring: Clinical Guide. 4th ed. Abbott Laboratories; 2017. Disponible en: https://www.corelaboratory.abbott/sal/learningGuide/AD-D-00061347_TDM_Learning_Guide.pdf
7. Grupo Español de Farmacocinética y Farmacogenómica de la SEFH. Manual de rotación del residente por la Unidad de Farmacocinética Clínica. Madrid: Luzán 5; 2011. Disponible en: <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/farmacocinetica/MANUA>

[LROTACIONRESIDENTE.pdf?utm_content=buffer5856d&utm_medium=social&utm_source=twitter.com&utm_campaign=buffer.](https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/farmacocinetica/MANUA)

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Calvo MV, García MJ, Martínez J, Fernández MM. Farmacocinética clínica. En: Bonal Falgas J, Domínguez-Gil Hurlé, Gamundi Planas MC et al, eds. Farmacia Hospitalaria. 3ª ed. Madrid: SCM; 2002. p. 625-65. Disponible en: <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo1/cap212.pdf>
- Felices F. Toxiconet [Internet]. Murcia: Consejería de Salud, Región de Murcia; 2020 [citado 8 octubre 2020]. Disponible en: http://www.murciasalud.es/toxiconet.php?op=listado_protocolos&idsec=4014.
- Hallworth M, Watson I. Therapeutic Drug Monitoring: Clinical Guide. 4th ed. Abbott Laboratories; 2017. Disponible en: https://www.corelaboratory.abbott/sal/learningGuide/AD-D-00061347_TDM_Learning_Guide.pdf.
- Saphiro L, Shear N. Drug interactions: Proteins, pumps, and P-450s. J Am Acad Dermatol. 2002; 47(4):467-8.
- Walls R, Hockberger R, Gausche-Hill M. Rosen's Emergency Medicine: Concepts and Clinical Practice. 9ª ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018.

INTERACCIONES GRAVES ENTRE ANTIRRETROVIRALES Y OTROS FÁRMACOS A PROPÓSITO DE UN CASO

Autores: Laura Carrasco Parrón, Alba Fernández del Pozo

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Fármacos, Antirretrovirales, Interacciones

CASO CLÍNICO

Varón de 52 años con infección por VIH, antecedentes de alcoholismo crónico y deterioro cognitivo moderado-grave, que ingresa en el Servicio de Traumatología por fractura de húmero. Durante el ingreso, el paciente manifiesta alteraciones conductuales que se controlan con la asociación de neurolépticos, carbamazepina y olanzapina; y benzodiazepinas como clonazepam. Además, el paciente se encuentra en tratamiento antirretroviral con Truvada® (emtricitabina + tenofovir) y Kaletra® (lopinavir).

En una de las valoraciones por parte del Servicio de Medicina Interna, el paciente se encuentra somnoliento pero despierto a la llamada, inatento y desorientado en espacio/tiempo. En base a los datos clínicos y siendo la intoxicación farmacológica la principal sospecha, se solicita la determinación de los niveles de carbamazepina al laboratorio, obteniéndose un resultado de 25,4 µg/ml (rango terapéutico: 4-8 µg/ml en politerapia). Ante la evidente intoxicación, se inicia la búsqueda bibliográfica encontrándose interacciones entre varios fármacos administrados al paciente.

ANTIRRETROVIRALES

El tratamiento antirretroviral de gran actividad o TARGA ha permitido un buen control de la infección por VIH en los últimos años. Sin embargo, gran parte de estos pacientes presentan, además, otras comorbilidades y por ello, medicación concomitante que puede interactuar con el tratamiento antirretroviral.

Las pautas recomendadas para el tratamiento inicial de la infección por el VIH-1 en el momento actual consisten en una combinación de 3 fármacos que incluyan 2 inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN) asociados a un inhibidor de la integrasa (INI), un inhibidor de transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos (ITINAN), o un inhibidor de la proteasa (IP) potenciado con ritonavir (Figura 1). Solo en el caso de que no puedan utilizarse tenofovir o abacavir, ambos ITIAN, (como es el caso dado que el paciente es alérgico a abacavir), se pueden recomendar combinaciones de 2 fármacos antirretrovirales que excluyan uno o ambos ITIAN, pero en el momento actual ninguna de estas opciones puede ser considerada preferente para el inicio del TAR.

CLASIFICACIÓN

- **Inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN)**

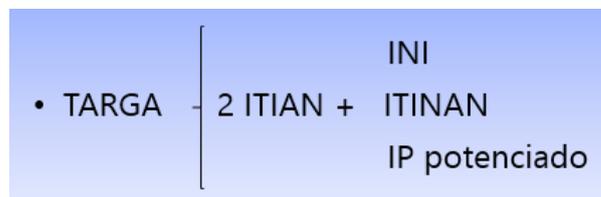


Figura 1. Pauta recomendada para el tratamiento del VIH. Elaboración propia

Son los más antiguos y suelen constituir la base de los tratamientos antirretrovirales. Su activación se produce en el interior de la célula donde se fosforilan, pasando del metabolito difosfato al trifosfato con diferentes bases nitrogenadas actuando como análogos de los diferentes desoxinucleótidos trifosfato. Más tarde serán incorporados por la transcriptasa inversa en el ADN del virus resultando en una terminación de cadena debido a la ausencia del 3'-OH. El virus VIH puede desarrollar resistencia a estos antirretrovirales mediante mutaciones en la transcriptasa inversa que le permitirían distinguir entre nucleótidos verdaderos y análogos (mutaciones puntuales M184V o K65R), o defosforilar los análogos y eliminarlos de la cadena de ADN una vez incorporados (mutación puntual T215Y).

- Abacavir: análogo de guanina.
- Lamivudina y emtricitabina: análogos de citosina.
- Tenofovir: análogo de adenina. Es análogo de nucleótido.
- Zidovudina: análogo de timidina.
- **Inhibidores de transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN)**

Se unen al sitio alostérico de la transcriptasa inversa provocando un cambio conformacional en ella e impidiendo su unión al siguiente nucleótido. La segunda generación de ITINAN fue desarrollada cuando el virus VIH empezó a sufrir mutaciones que le dotaban de resistencia frente a la primera generación de ITINAN. Son efavirenz, nevirapina, rilpivirina y doravirina.

- **Inhibidores de la integrasa (INI)**

Estos antirretrovirales se unen a un resto de magnesio de la integrasa del virus evitando la inserción del ADN viral en la célula. El sitio al que se unen puede ser quelado por cationes polivalentes como calcio, aluminio, zinc y hierro. Se considera que los inhibidores de la integrasa tienen una barrera alta a la resistencia, ya que se requieren varias mutaciones puntuales para conferir resistencia. Son raltegravir, elvitegravir, dolutegravir, bictegravir y cabotegravir.

- **Inhibidores de la proteasa (IP)**

Se unen a la proteasa del virus VIH y evitan la escisión de las proteínas Gag-Pol en las células infectadas, lo que impide la maduración de las partículas virales. Son atazanavir y darunavir.

- **Inductores**

Los inductores farmacocinéticos se emplean para incrementar las concentraciones de elvitegravir (INI) y los IPs ya que inhiben el CYP3A4. También incrementan las concentraciones de tenofovir (ITIAN) mediante la inhibición de la gp-P. Los inductores son ritonavir y cobicistat.

- **Inhibidores de la entrada**

En este grupo encontramos 3 agentes con distinto mecanismo de acción. Estos antirretrovirales están reservados a pacientes con múltiples resistencias a otras clases de antirretrovirales.

Ibalizumab

Es el único inhibidor de la fijación aprobado actualmente por la FDA. Se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al dominio 2 de CD4, bloqueando la fusión del virus con la célula huésped.

Maraviroc

Es el único antagonista del correceptor CCR5 aprobado por la FDA para el tratamiento de VIH. Maraviroc se une a CCR5 en la superficie de las células CD41, evitando que la proteína de superficie gp120 interactúe con el correceptor. El virus VIH puede usar como correceptor CCR5, CXCR4 o ambos, por lo que se deben realizar pruebas de tropismo del virus al paciente antes del inicio del tratamiento con maraviroc.

Enfuvirtida

Es el único inhibidor de la fusión aprobado por la FDA para el tratamiento de VIH. Su mecanismo de acción consiste en la unión a la subunidad gp41 de la envoltura del virus. De esta forma se inhibe la fusión del virus con las membranas celulares.

METABOLISMO

Los citocromos P450 son una familia de enzimas responsables de la mayoría de los procesos oxidativos de las sustancias exógenas (medicamentos, alimentos, etc.) y endógenas. Aunque se hayan identificado más de 30 subtipos, el CYP3A4 es uno de los más importantes, siendo responsable de la biotransformación del 60% de los fármacos. Aunque su actividad metabólica tenga diferencias interindividuales, no parece sujeto a polimorfismos genéticos como otras isoformas del CYP. El CYP3A4 se encuentra principalmente en el hígado y, en menor cantidad, en el intestino delgado, siendo importante en el metabolismo de los fármacos y otras sustancias exógenas. Un gran número de fármacos de varias categorías terapéuticas son sustratos del CYP3A4.

Hay que subrayar que algunas sustancias que son sustratos del CYP3A4 son también sustratos de la glucoproteína P, una proteína de transporte activo transmembrana

dependiente del ATP presente en varios órganos, entre ellos hígado, encéfalo, intestino y riñón, que actúa como un transportador que expulsa las sustancias de los enterocitos, reduciendo la llegada a la circulación portal, y aumenta la excreción de los fármacos en la bilis y la orina, disminuyendo de esta forma la cantidad de fármaco que llega a la circulación sistémica y que actúa en los órganos diana.

Algunas sustancias son sustratos de ambos y son capaces de inhibir o inducir ambos mecanismos de eliminación. Algunas interacciones que se creían solo consecuencia de la inhibición del CYP3A4 son en realidad mediadas también por la inhibición de la glucoproteína P.

El espectro del metabolismo de los fármacos antirretrovirales es complejo, ya que cada fármaco se metaboliza a través de diferentes isoenzimas y es difícil realizar generalizaciones basadas en diferentes clases de fármacos.

- **Inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN)**

No son metabolizados por las enzimas del citocromo P450 (CYP), lo que da como resultado menos interacciones farmacológicas.

- **Inhibidores de transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN)**

Son sustratos e inductores del CYP3A4 (excepto efavirenz y etravirina que pueden ser inhibidores). La coadministración de esta clase de fármacos puede disminuir la eficacia de algunas sustancias como, por ejemplo, en el caso de los fármacos antineoplásicos.

- **Inhibidores de la proteasa (IP)**

Son, por lo general, sustratos e inhibidores del CYP3A4, por lo que su coadministración con fármacos metabolizados a través del CYP3A4 puede acarrear toxicidad debida a un aumento de los niveles plasmáticos de los fármacos implicados.

- **Inhibidores de la integrasa (INI)**

Se metabolizan por glucuronoconjugación principalmente a través de la enzima UGT1A1, con consecuente menor potencial de interacciones respecto a IP e ITINAN.

- **Inductores**

Cobicistat es un potente inhibidor del CYP3A4, aprobado como potenciador de elvitegravir (INI) y de los IP. Cobicistat es sustrato del CYP3A4 y minoritariamente del 2D6. Asimismo, es inhibidor de CYP3A4, CYP2D6 y de los transportadores P-gp, BCRP, OATP1B1 y OAT1B3. La asociación de cobicistat con fármacos que sean sustrato de las anteriores enzimas y transportadores puede dar lugar a un aumento de sus concentraciones plasmáticas.

- **Inhibidores de la entrada**

Maraviroc (inhibidor del correceptor CCR5), es sustrato, pero no inhibidor ni inductor del CYP3A4 y de la glucoproteína P y es susceptible a múltiples interacciones farmacológicas que implican ajuste de dosis.

INTERACCIONES

Una interacción farmacológica se acepta como clínicamente relevante cuando la eficacia o la toxicidad de un fármaco se alteran de forma significativa tras la administración de otras sustancias. El mecanismo de interacción puede ser farmacocinético o farmacodinámico. Las interacciones más comunes son las farmacocinéticas y pueden implicar cambios en la tasa de absorción, distribución, metabolismo o excreción (biliar, renal o pulmonar).

Se estima que las interacciones clínicamente relevantes entre fármacos antirretrovirales y medicación concomitante pueden alcanzar una proporción del 27 al 40%, siendo los factores de riesgo más importantes el uso de inhibidores de la proteasa potenciados con ritonavir, el número de medicaciones concomitantes, la coinfección con el virus de la hepatitis C y el abuso de sustancias.

Un trabajo de Yiu et al.¹ registra retrospectivamente las interacciones farmacológicas clínicamente significativas ocurridas en 110 pacientes jóvenes (<50 años) y mayores (>50 años) que recibieron TARGA durante un año para analizar las posibles diferencias relativas a la edad. Dentro de las interacciones relacionadas con el TARGA, los IP fueron los agentes que presentaron más interacciones tanto en pacientes jóvenes (44%) como en pacientes mayores (42%), seguidos por los ITIAN (18.1 y 15.4%) y los ITINAN (12.0 y 15.7%).

En cualquier caso, las interacciones de los antirretrovirales con otros fármacos son complejas y muchas veces sujetas a variaciones interindividuales dependientes también de los antecedentes genéticos y de la alimentación.

Las interacciones entre ITIAN utilizados en la actualidad no son en la mayoría de los casos clínicamente relevantes. Sin embargo, sí que lo son las interacciones entre antirretrovirales ITINAN, IP potenciados con ritonavir e inhibidores de la integrasa y otros fármacos que pueden poner en peligro la vida o la salud del paciente.

A pesar de que la isoenzima implicada en la mayoría de interacciones importantes es el CYP3A4, en algunas ocasiones pueden producirse interacciones mediadas por CYP2C9 o 2C19. Curiosamente, ritonavir se comporta como inductor de esa isoenzima, y efavirenz y etravirina se comportan como inhibidores (justo al contrario del efecto que ejercen sobre el CYP3A4). De esta forma, podemos entender que ritonavir pueda reducir la eficacia terapéutica de voriconazol, fenitoína o de los anticoagulantes orales, cuyo metabolismo es mediado principalmente por CYP2C9 y 2C19.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS GRAVES DE LAS INTERACCIONES CON FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES

- **Rabdomiólisis**

Las estatinas son fármacos inhibidores de la HMG-CoA reductasa utilizados de forma extensa para tratar la hipercolesterolemia. Uno de los efectos secundarios descritos en asociación a su uso es la elevación de la creatinina sérica y mialgia. Se han descrito casos de

rabdomiólisis grave asociada a fracaso renal agudo por mioglobinuria. Las estatinas son sustrato de OATP1B1 y OATP1B3, transportadores de membrana que permiten que estas entren en el hepatocito, donde realizan su acción.

Estudios in vitro indican que los IP inhiben estos transportadores, con lo que podría empeorar la relación beneficio/riesgo de las estatinas, disminuyendo su efecto y aumentando el riesgo de miotoxicidad por un aumento de sus concentraciones plasmáticas.

Por otro lado, algunas estatinas como lovastatina, simvastatina y atorvastatina se metabolizan por el CYP3A4. Por lo que es conveniente no asociarlas a inhibidores de la proteasa. No se han descrito interacciones relevantes entre estatinas y otros fármacos antirretrovirales (ITIAN, raltegravir, maraviroc, rilpivirina o etravirina).

Los síntomas de esta interacción consisten en la triada característica de la rabdomiólisis: dolor muscular, debilidad y orina oscura. Sin embargo, más de la mitad de los pacientes pueden no informar síntomas musculares. Entre los hallazgos de laboratorio encontramos:

- Elevación de la CK y otras enzimas musculares séricas.
 - Orina de color marrón rojizo de mioglobinuria. Puede observarse en solo la mitad de los casos, por lo que su ausencia no excluye el diagnóstico.
 - Las pruebas de laboratorio de rutina, que incluyen recuento sanguíneo completo, velocidad de sedimentación globular (VSG) y proteína C reactiva (PCR) varían mucho según la causa subyacente de la rabdomiólisis. La elevación en las transaminasas séricas también es común.
- **Sedación excesiva, coma y otros trastornos neurológicos**

Benzodicepinas

Se han descrito interacciones farmacológicas clínicamente relevantes entre ritonavir y diferentes psicofármacos, incluyendo midazolam, triazolam, alprazolam, diazepam, zopiclona y buspirona. En este caso, es complicado establecer un patrón de interacción general puesto que las benzodicepinas presentan diversos metabolitos activos. Por ejemplo, diazepam es metabolizado por el CYP3A4 y el 2C19 por lo que podría aumentar la sedación en presencia de inhibidores del CYP3A4, como los IP, o del CYP2C19, como efavirenz o etravirina.

En general, la benzodicepina que presenta menor riesgo de interacción con los antirretrovirales por su metabolismo (glucuronidación) es lorazepam. Los ITIAN, rilpivirina, raltegravir y maraviroc se pueden administrar de forma segura con las benzodicepinas.

Antipsicóticos

La interacción farmacocinética entre los IP y los antipsicóticos a nivel de algunas isoenzimas del citocromo P450 implicadas en el metabolismo de la mayoría de ellos, puede producir aumentos importantes de sus niveles

plasmáticos. En general, con los antipsicóticos eliminados mediante el citocromo P450 se recomienda empezar con dosis bajas en pacientes tratados con IP y aumentar las dosis progresivamente.

Antiepilepticos

Se han descrito casos de vértigos, somnolencia, desorientación, ataxia, vómitos y sedación excesiva en pacientes que recibían fármacos antiepilepticos como carbamazepina en concomitancia con la administración de IP. La coadministración requiere monitorización clínica y una bajada de la dosis de carbamazepina. Hay que tener en cuenta que carbamazepina, fenitoína y fenobarbital, potentes inductores del CYP3A4, pueden reducir las concentraciones plasmáticas de IP potenciados, ITINAN y maraviroc por inducción de su metabolismo, con mayor riesgo de fracaso virológico.

En 2012 se publicó una guía² para el uso conjunto de fármacos anticomiciales y antirretrovirales. Esta guía aconseja monitorizar estrictamente los niveles de anticomiciales y antirretrovirales y evitar algunas asociaciones. En muchos casos es necesario buscar alternativas terapéuticas, como utilizar fármacos anticomiciales no inductores enzimáticos como levetiracetam, pregabalina, gabapentina o lamotrigina; o antirretrovirales que no inhiban ni induzcan ni sean sustrato del CYP3A4 como los ITIAN, raltegravir o dolutegravir.

Analizando nuestro caso, observamos que el paciente está en tratamiento con un IP, inhibidor del CYP3A4 y con carbamazepina, inductor del CYP3A4, lo que, como hemos visto, puede dar lugar a la pérdida de eficacia terapéutica del IP, por inducción de su metabolismo e intoxicación por carbamazepina por inhibición de su metabolismo.

- **Rechazo de injerto**

Es el caso del uso concomitante de antirretrovirales e inmunosupresores en pacientes receptores de trasplante de órgano sólido infectados por el VIH. Uno de los principales problemas en el periodo posterior al trasplante son las interacciones farmacocinéticas entre los fármacos inmunosupresores y antirretrovirales. El manejo combinado de la terapia antirretroviral e inmunosupresora puede ser extremadamente difícil debido a las interacciones entre inmunosupresores y TARGA, con un mayor riesgo de rechazo del injerto y de toxicidad farmacológica.

Tacrolimus, sirolimus y ciclosporina A son sustratos de CYP3A4 e inhibidores de la glucoproteína P. Los IP pueden aumentar de forma significativa los niveles de los inmunosupresores, aumentando la toxicidad. Los ITINAN pueden afectar la eficacia de los inmunosupresores disminuyendo sus niveles plasmáticos por inducción enzimática, aunque la intensidad de la interacción es menor comparada con los IP. Otro fármaco muy utilizado como inmunosupresor, el ácido micofenólico (el metabolito activo del micofenolato de mofetilo) es sustrato de la glucuroniltransferasa por lo que su riesgo de interacción es menor.

- **Casos mortales**

Además del potencial de interacciones entre antirretrovirales y fármacos prescritos por facultativos, hay que tener en cuenta el potencial de interacciones entre antirretrovirales y fármacos con los cuales el paciente se automedica o drogas ilegales de uso recreacional. Sin embargo, se tiene que prestar particular atención y el paciente tendría que ser consciente del riesgo que acarrea el uso concomitante de algunas drogas de abuso y fármacos antirretrovirales, especialmente los IP.

Por ejemplo, se han descrito casos mortales de intoxicación por MDMA o "éxtasis" en el contexto de tratamiento con ritonavir. El "éxtasis" se metaboliza principalmente a través del CYP2D6 y ritonavir es un inhibidor de esta isoenzima. Adicionalmente, del 3 al 10% de individuos de raza blanca son metabolizadores lentos a nivel del CYP2D6. Pueden darse importantes incrementos (de hasta 10 veces) en los niveles plasmáticos de "éxtasis", por lo que esta combinación puede ser peligrosa incluso con dosis muy bajas de ritonavir, como las que se usan en asociación con atazanavir o darunavir.

La cocaína es otro ejemplo de droga de abuso, en este caso metabolizada principalmente por esterasas plasmáticas con una vía minoritaria en la que interviene el CYP3A4, formándose norcocaína (metabolito tóxico), en porcentaje mayor en sujetos con déficit de colinesterasa. La administración simultánea de cocaína y ritonavir (pero también otros IP) puede reducir el metabolismo provocando aumento de la concentración plasmática de cocaína y la toxicidad. Mientras que, los inductores del CYP3A4 como efavirenz o nevirapina podrían aumentar la producción de norcocaína, contribuyendo igualmente al aumento de la toxicidad.

Notables son también las interacciones entre ITINAN e IP y la metadona, agonista opiáceo ampliamente utilizado en los tratamientos de deshabituación de heroína. La metadona se metaboliza primariamente por el CYP3A4 con contribuciones del CYP2D6, CYP2C9, CYP2E1 y en parte por glucuronidación. El CYP2B6 juega un papel en el metabolismo estereoselectivo de metadona, y ello podría justificar la importante interacción que presenta con nevirapina y efavirenz, pues ambos son inductores del CYP2B6 además del CYP3A4. Por tanto, en pacientes en tratamiento estable con metadona que inicien nevirapina y efavirenz los niveles pueden bajar considerablemente, provocando síntomas de abstinencia.

CONCLUSIONES

La mayoría de interacciones tienen lugar mediante el efecto inductor o inhibidor sobre el citocromo P450 a nivel hepático y/o la glucoproteína P. Los IP, especialmente los potenciados con ritonavir, se comportan como potentes inhibidores del CYP3A4 y son los fármacos a los cuales más frecuentemente se ha relacionado con reacciones graves como consecuencia de interacciones farmacológicas.

Es fundamental el conocimiento de las principales interacciones entre fármacos antirretrovirales y otros medicamentos, no solo para los especialistas en el campo

sino también para otros profesionales sanitarios que tratan a estos pacientes ya que, fármacos de la mayoría de las categorías terapéuticas pueden tener interacciones incluso mortales con la medicación antirretroviral. Asimismo, es imprescindible la colaboración y la comunicación entre los diferentes especialistas implicados en el cuidado del paciente y el acceso de los mismos a todos los medicamentos prescritos al paciente.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Yiu P, Nguyen NN, Holodniy M. Clinically significant drug interactions in younger and older human immunodeficiency virus-positive patients receiving antiretroviral therapy. *Pharmacotherapy*. 2011;31(5):480-9.
2. MonografíasAIDSinfo. (2018). Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV. Department of Health and Human Services, 298.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Manzardo C, Tuset M, Miró JM, Gatell JM. Severe or life-threatening interactions between antiretrovirals and non-HIV drugs. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(7):e15-30.
- Dionne B. Key Principles of Antiretroviral Pharmacology. *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(3), 787–805.
- Noguera A, Massó J, Soy D, Codina C, Ribas J. Sirolimus: Una nueva alternativa en el tratamiento inmunosupresor. *Farm Hosp*. 2002;26(2):96–105.

HOJA DE RUTA PARA ACREDITARSE MEDIANTE ALCANCE FLEXIBLE EN UN LABORATORIO CLINICO ANTERIORMENTE ACREDITADO POR LA NORMA ISO 15189 CON ALCANCE FIJO

Autores: Daniel Párraga García, Laura Parés Pollán

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital 12 de Octubre, Madrid

Palabras Clave: Alcance flexible, ENAC, Acreditación

INTRODUCCIÓN

La Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) es la entidad designada por el Gobierno, para operar en España como el único Organismo Nacional de Acreditación, en aplicación del Reglamento (CE) nº765/2008 que regula el funcionamiento de la acreditación en Europa, que se asienta en cinco principios fundamentales:

- Ausencia de ánimo de lucro.
- Independencia.
- No competencia.
- Evaluación internacional.
- Reconocimiento mutuo.

ENAC es una asociación sin ánimo de lucro y declarada de utilidad pública. Su estructura y principios de funcionamiento garantizan que todas sus actuaciones se basan en los principios de imparcialidad, independencia y transparencia, contando en sus órganos de gobierno con todas las partes interesadas en el proceso, esto es, los acreditados, la industria usuaria de sus servicios y las administraciones públicas. Esto incluye a los laboratorios clínicos del ámbito público y privado, que son a los que va dirigido este tema.

El alcance de acreditación es el documento que describe las actividades para las que un laboratorio clínico está acreditado, proporcionando a todos los potenciales usuarios de ese laboratorio una información clara sobre aquellas actividades para las que ha demostrado competencia técnica.

El alcance de acreditación en vigor (Anexo Técnico) es un documento que se hace público y que acompaña al certificado de acreditación del laboratorio. En la figura 1 se muestra la ruta para poder consultar dichos documentos en la web de ENAC. Una vez acreditados, los laboratorios pueden realizar ampliaciones o modificaciones a su alcance, solicitando una nueva evaluación por parte de ENAC.

En un alcance tradicional, cada cambio realizado en una técnica o equipo por pequeño que fuese necesita de una nueva reevaluación por ENAC, de manera que durante dicho cambio y la evaluación, la prueba debe de desacreditarse quedando reflejado en el citado listado y en el informe de resultados del laboratorio.

Sin embargo, debido a la constante evolución de las necesidades de los laboratorios clínicos, como es la inclusión de nuevas magnitudes biológicas en su cartera de servicios o la actualización de métodos y equipos, surge la necesidad de establecer mecanismos que permitan que, aplicando los

procedimientos adecuados y bajo ciertas condiciones, los laboratorios puedan llevar a cabo estas actividades sin requerir la evaluación previa de ENAC.

Permitirá demostrar, no sólo que se dispone de la competencia para realizar una serie de pruebas, sino también que se ha establecido un sistema que garantiza que, antes de incorporar una nueva prueba o una modificación que afecta a pruebas ya acreditadas, se han realizado todas las actividades necesarias que garantizan que los informes emitidos bajo acreditación cumplen todos los requisitos establecidos en la norma UNE-EN ISO 15189.

A continuación, veremos los distintos tipos de alcance que existen, así como los diferentes subtipos de alcance flexible.

TIPOS DE ALCANCE

El alcance de la acreditación hace referencia a las actividades en las que un laboratorio ha demostrado ser competente, incluyendo todas las etapas del proceso, preanalítico, analítico y postanalítico.

Este alcance puede ser fijo (donde cualquier modificación, incorporación de nuevas pruebas, áreas o especímenes requerirá de una nueva evaluación de ENAC tras la solicitud de ampliación), o flexible.

1. En la elaboración del documento de alcance fijo se debe incluir la descripción de las pruebas y la información detallada de la técnica/ método empleado:
 - Espécimen/muestra.
 - Definición de las pruebas / analitos / estudios.
 - Método/Procedimiento y equipo si procede.
2. Para el alcance flexible, el laboratorio define el alcance a partir de los mismos elementos descritos en los alcances fijos expresados en una forma más genérica.

En este caso, los límites de la flexibilidad deben quedar claramente reflejados de manera que no dé pie a ningún tipo de confusión (Figura 1). Existen principalmente dos tipos de flexibilidad, donde puede referirse a:

- Flexibilidad en las pruebas.
- Flexibilidad en los métodos / procedimientos / equipos.
- Una combinación de 2 o más de las anteriores.

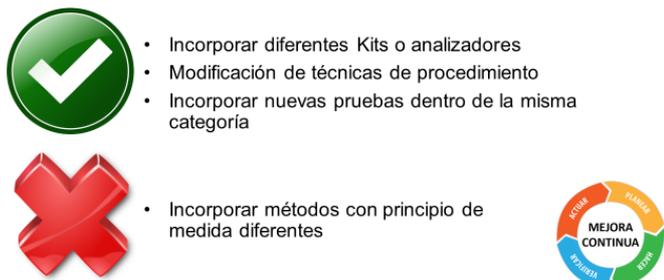


Figura 1. Limitaciones del alcance flexible. Elaboración propia

Debe de quedar claro que la flexibilidad no incluye en ningún caso la posibilidad de introducir métodos con principios de medida diferentes de los ya incluidos en el alcance de la acreditación. Un ejemplo en el que no se podría incluir el alcance flexible sería cambiar la realización del cobre por absorción atómica a un equipo de espectrofotometría.

REQUISITOS ESPECÍFICOS

No todos los laboratorios tienen de primeras acceso a una acreditación por alcance flexible. Se deben de cumplir una serie de requisitos recomendables para realizar la solicitud de acreditación a ENAC. A continuación, se listan los principales:

- Disponer de amplia experiencia en el ámbito de flexibilidad que se solicita. No es estrictamente necesario que previamente el laboratorio esté acreditado con alcance fijo, pero si es recomendable ya que habrá demostrado la suficiente confianza para abordar el proyecto.
- Definir claramente los límites de la flexibilidad.

- Demostrar resultados satisfactorios en aseguramiento de la calidad y auditorías ENAC.
- Disponer de un Sistema de Gestión de la Calidad que haya demostrado confianza.
- Elaborar y mantener una lista actualizada con las pruebas y los cambios.
- Proporcionar a ENAC la información antes de las auditorías de seguimiento.

REQUISITOS DEL SISTEMA DE GESTIÓN

El sistema de gestión de la calidad también debe de cumplir una serie de requisitos para garantizar la gestión adecuada del alcance flexible. Se detallan a continuación:

4.1. Organización y personal:

- La dirección del laboratorio debe de autorizar a las personas técnicamente competentes y asignarles las responsabilidades claves para la gestión del sistema, (verificación, validación de métodos, inclusión de nuevas pruebas o cambios en listas).
- Asimismo, debe definir los requisitos de cualificación para las personas que asuman dichas responsabilidades

A continuación, se muestra un ejemplo para una gran organización con 5 servicios (Figura 3a) y las asignaciones de responsabilidades de un responsable de calidad de un servicio (Figura 3b).



Organización de la Unidad de Calidad

Teniendo en cuenta la distintas especialidades de laboratorio y el alto número de profesionales implicados, se consideró que bajo una **coordinación global** existiera en cada laboratorio **un responsable de calidad (RCU)**

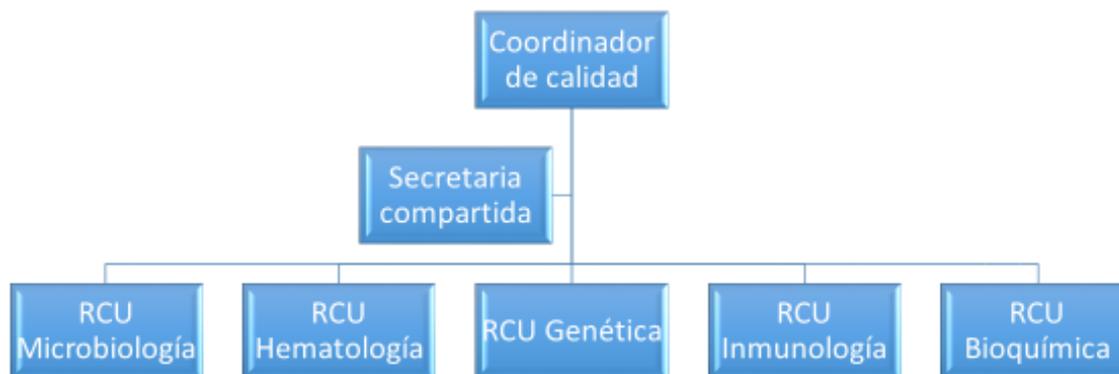


Figura 2. Organización de la Unidad de Calidad. Elaboración propia

Funciones como responsable de calidad de Bioquímica

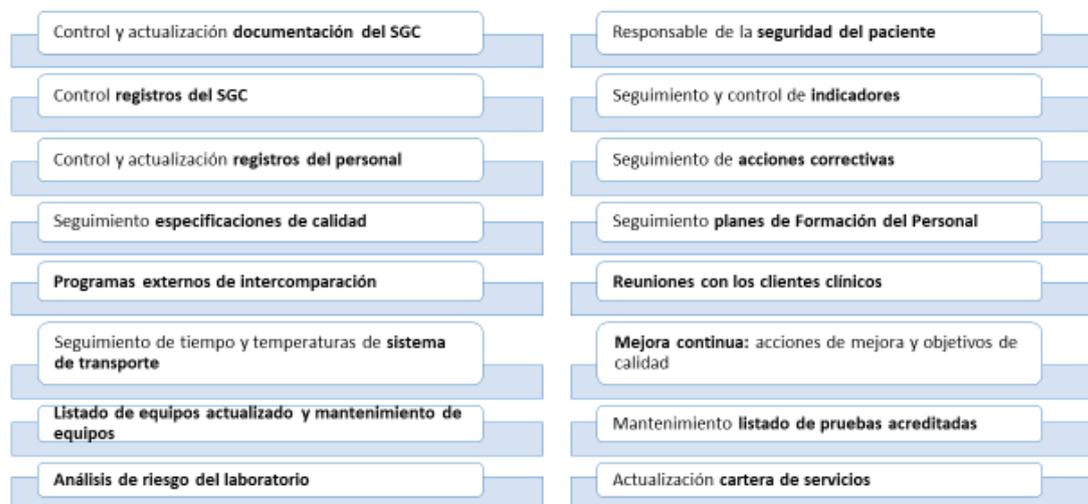


Figura 3a. Organigrama de reparto de responsabilidades para el establecimiento de un SGC competente. **3b.** Asignación de responsabilidades a un RCU de un servicio clínico de laboratorio. Elaboración propia.

Se deben elaborar documentos que recojan la sistemática de cómo se garantiza que antes de emitir informes de pacientes se han seguido todos los pasos necesarios que aseguren el cumplimiento de todos los requisitos de la norma ISO 15189 ante un cambio o incorporación. Se deberán tener en cuenta todas las fases del proceso analítico:

- Fase preanalítica (ej: condiciones de la obtención y conservación de la muestra, transporte, criterios de calidad de la muestra, etc.).
- Fase analítica: Sistemática de verificación o validación, IRB, etc)
- Fase postanalítica (ej: criterio de revisión de resultados, inclusión de comentarios en el informe)

Se muestran a continuación ejemplos de un *check-list* con los parámetros más importantes a comprobar para realizar la inclusión de un nuevo cambio permitido (Figura 4).

- Aseguramiento de la calidad: Se deberán incluir actividades tanto de control de calidad interno como la participación en programas de intercomparación de las pruebas dentro del alcance flexible.

- Registros: deberán conservarse registros que evidencien las actividades realizadas antes de la emisión de resultados a pacientes tras los cambios o incorporaciones realizadas.

- Auditorías internas y revisión del sistema por la dirección

SOLICITUD DEL PROCESO DE EVALUACIÓN

Para la solicitud de acreditación por alcance flexible se deben aportar 3 documentos:

1. Identificación en el alcance de los límites de flexibilidad (Figura 5a).

 UNIDAD DE CALIDAD DEL LABORATORIO	INSTRUCCIÓN TÉCNICA PARA EL CHECK LIST ANTE CAMBIOS EN PRUEBAS, EQUIPOS O MÉTODOS EN EL ALCANCE FLEXIBLE IT-LAB-13	Realizado por: Laura Parés Pollán Daniel Párraga García	Edición 2
		Revisado y aprobado por: Jefes de Servicio	Hoja 1 of 2
			Fecha: 17/08/2020

CONTROL DE EDICIONES			
ED	FECHA	HOJA/S	CAUSA DEL CAMBIO
2	17/08/2020	1	Se amplía la lista y se añade campo de fecha y firma del responsable

NOTA: En esta instrucción se dan directrices para la comprobación de todos los ítems preanalíticos, analíticos y postanalíticos que pueden verse afectados ante un cambio en las pruebas, metodologías o equipos en un alcance flexible.

El alcance flexible no incluye cambiar métodos con principio de medida diferentes de los ya incluidos en el alcance de la acreditación (ejemplo cambiar del método de espectrometría para determinar Hierro al método de absorción atómica)

1. ASPECTOS PREANALÍTICOS
 - ¿Se ha modificado la preparación del paciente?
 - ¿Se ha modificado el espécimen?
 - ¿Se ha modificado el recipiente de recogida de muestra?
 - ¿Se ha modificado el tiempo de conservación de la muestra?
 - ¿Se han modificado aspectos preanalíticos como la centrifugación, preservación de la luz, condiciones específicas de temperatura, etc?
 - ¿Se ha informado a los profesionales o se han realizado las actividades formativas?
 - ¿Implica nuevos registros preanalíticos?
2. ASPECTOS ANALÍTICOS
 - ¿Se ha realizado la verificación del nuevo método?
 - ¿Se ha realizado la intercambiabilidad entre equipos cuando en el laboratorio hay equipos duplicados?
 - ¿Se dispone de programa de intercomparación para la prueba en el nuevo método?
 - ¿El nuevo método cumple con las especificaciones de calidad?
 - ¿Los profesionales del laboratorio han recibido formación?
 - ¿Implica nuevos registros analíticos?
 - ¿Se ha comprobado la correcta actividad de los controles internos?
 - ¿Se ha consultado el límite de linealidad, el límite de cuantificación y detección y los interferentes del Insert validado por la casa comercial, y se ha actualizado dichos datos en el procedimiento técnico de la prueba?
3. ASPECTOS POSTANALÍTICOS
 - ¿Afecta el cambio de método a los valores de referencia?
 - ¿Implica el nuevo método la realización de nuevos comentarios?
 - ¿Afecta el cambio de método a la configuración del informe?

Responsable de la verificación del check list:	Fecha y firma:

Figura 4. Ejemplo de *check-list* a seguir para incorporación de una prueba/método. Elaboración propia.

2. Documentación que describa el sistema del laboratorio y sistemática detallada de verificación/validación.
3. Lista de las pruebas ya validadas/verificadas (Figura 5b)

También se deberá presentar otra documentación que ENAC considere necesaria. A continuación vamos a detallar estos tres documentos con más profundidad:

- **Delimitar la flexibilidad**

Se debe especificar si la flexibilidad solicitada es de espécimen/muestra o de pruebas/métodos, siendo en la mayoría de los casos más interesante ésta última.

1. La flexibilidad por espécimen/muestra:

Hace referencia a si tenemos una técnica validada para un espécimen, podríamos añadir otro distinto. No obstante, en la práctica esto no es útil.

Como ejemplos podemos ver un laboratorio que se acredita para un cultivo de muestra faríngea. Si necesitase acreditarse para un cultivo de sangre (hemocultivo), debería solicitar ampliación al no parecerse en nada las técnicas a realizar. Una excepción donde sí podría ser útil podría ser la de

ESPÉCIMEN / MUESTRA	PRUEBAS/ESTUDIOS Método	PROCEDIMIENTO (Método comercial, procedimiento interno, protocolos reconocidos, equipos)
Suero Plasma heparina litio Sangre total fluoruro de sodio/oxalato potásico y EDTA Orina Líquido cefalorraquideo	Espectrometría	PT-BIO-06 PT-BIO-05_01 IT-CORE LAB 06, 17, 18, 22

ESPÉCIMEN / MUESTRA	PRUEBAS/ESTUDIOS Método	PROCEDIMIENTO (Método comercial, procedimiento interno, protocolos reconocidos, equipos)
Suero Plasma heparina litio Orina	<u>Inmunoturbidimetría</u>	PT-BIO-06 PT-BIO-05_01 IT-CORE LAB 18,22, 23

ENZIMAS Y SUBSTRATOS LABORATORIO CORE			
ESPÉCIMEN/MUESTRA	PRUEBAS/ESTUDIOS ESPECTROMETRÍA	Fecha acreditación	PROCEDIMIENTO Método comercial c701 COBAS 8000
Suero (1)	Alanina aminotransferasa (1,2) Tampón Tris Concentración alanina >225 mM	24/11/2017	PT-BIO-CORE LAB-35 (Ed. 2; 26/04/2017)
Plasma heparina litio (2)	Albúmina (1,2) Verde de bromocresol (BCG)	24/11/2017	PT-BIO-CORE LAB-30 (Ed. 3; 26/04/2017)
	Aspartato aminotransferasa (1,2) Tampón Tris Concentración aspartato >100mM	24/11/2017	PT-BIO-CORE LAB-49 (Ed. 2; 26/04/2017)
	Bilirrubina Total (1,2) 2,4 y 2,5 dicloroanilina diazoada (DPD)	24/11/2017	PT-BIO-CORE LAB-36 (Ed. 2; 26/04/2017)
	Bilirrubina Conjugada (1,2) 2,5 Dicloroanilina diazoada (DPD)	24/11/2017	PT-BIO-CORE LAB-10 (Ed. 3; 26/04/2017)

Figura 5a. Ejemplo de solicitud de alcance flexible por categorías. **5b** Ejemplo de lista de control de pruebas acreditadas por alcance flexible. Elaboración propia

añadir diferentes pruebas a muestras de suero/plasma con diferentes anticoagulantes.

2. Limitación de la flexibilidad en pruebas/métodos

En este caso podríamos incorporar nuevas pruebas que se realizan por el mismo equipo y procedimiento, siendo en la práctica el alcance flexible que se solicita a ENAC.

Un ejemplo sería acreditar las hormonas por el autoanalizador de “enzimoinmunoensayo”. Es importante delimitar bien este alcance, ya que si solo indicásemos inmunoensayo, podrían abarcarse multitud de pruebas que no cumplirían con los requisitos de calidad establecidos por ENAC.

Así pues, debemos agrupar a las pruebas en categorías, siendo ésta un grupo de análisis que pueden incluirse conjuntamente por el tipo de magnitud medida o estudiada (ej: marcadores tumorales) y por la técnica o método analítico utilizado.

- **Sistemática detallada de validación/verificación**

El laboratorio debe de realizar uno o varios documentos donde recoja la sistemática de validación o verificación de nuevos métodos, teniendo en cuenta la incorporación de nuevos equipos, de cambio de equipos que utilicen el mismo método o la utilización de equipos duplicados.

Deberá tenerse en cuenta que, si no son equipos comerciales previamente validado con marca CE, a los que solo se les debería realizar la verificación, deberá de realizarse un documento para verificación y otro para la validación de métodos.

- **Lista de análisis acreditados**

Finalmente, los responsables de calidad deberán de realizar un listado con las pruebas acreditadas por alcance flexible, y mantener este listado siempre actualizado, dejando constancia de cualquier cambio indicando la fecha en la que se han empezado a emitir resultados acreditados.

MANTENIMIENTO DE LA ACREDITACIÓN

Durante las auditorías de seguimiento se comprobará la implantación y eficacia del control establecido por el laboratorio para la gestión de su alcance flexible. El laboratorio debe evidenciar que mantiene su capacidad técnica y que utiliza el sistema de gestión definido.

Para ello tres meses antes de la fecha prevista para el seguimiento, el laboratorio enviará la Lista identificando en ella los análisis concretos introducidos (escribiéndolos en cursiva negrita) desde la anterior evaluación de ENAC y el procedimiento analítico aplicable a la categoría si se ha modificado

CONCLUSIONES

El tránsito a un sistema calidad por alcance flexible es laborioso. Se debe trabajar en la elaboración de los 3 documentos exigidos por ENAC descritos en el apartado 5, para demostrar la competencia de poder realizar cambios en la forma de proceder para realizar el análisis de diferentes pruebas de laboratorio y seguir manteniendo una alta calidad analítica:

1. Delimitar la flexibilidad definiendo que pruebas y/o equipos se van a abordar y que tipo de flexibilidad se solicita.
2. Establecer una sistemática para la incorporación de pruebas, cambios de equipos, uso de equipos duplicados, actualización o mejora de tecnología de pruebas ya acreditadas, etc. Para ello debe quedar reflejado en uno o varios documentos la forma de proceder del laboratorio para la verificación de equipos comerciales con marca CE, o en el caso de que sea de elaboración propia, la validación de la técnica y/o pruebas en cuestión.
3. Realizar un listado de las pruebas acreditadas por alcance flexible, con registros de fechas donde queden reflejados todos los cambios derivados de la actualización de las mismas.

Así pues, el laboratorio puede garantizar que las pruebas informadas bajo acreditación cumplen todos los requisitos establecidos en la norma UNE-EN ISO 15189.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Entidad Nacional de Acreditación. Laboratorios clínicos: Alcances de acreditación. NT-48 Rev 2 Junio 2018. Serie 3. Anexo I: alcances fijos: identificación de los métodos analíticos en los alcances y acciones a tomar en caso de ser revisados. Anexo II: alcances flexibles: requisitos específicos. Madrid: ENAC; 2018.
- Asociación Española de Normalización. Norma UNE-EN ISO 15189:2013 Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia. Madrid: UNE; 2013.
- Entidad Nacional de Acreditación. CGA-ENAC-LCL, Rev.2, Octubre 2014. Criterios generales de acreditación de Laboratorios Clínicos. Madrid: ENAC; 2014. Disponible en: <https://www.enac.es/documents/7020/b569e184-a2aa-4dcd-88a5-1d1ceb9033db>
- Entidad Nacional de Acreditación. ENAC [página web]. Madrid. ENAC; 2021. Disponible en: www.enac.es

HERRAMIENTAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y PRIORIZACIÓN DE OPORTUNIDADES DE MEJORA EN UN LABORATORIO CLÍNICO

Autores: Daniel Párraga García, Laura Parés Pollán

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital 12 de Octubre, Madrid

Palabras Clave: Ciclo de mejora, Acción de mejora, Calidad

INTRODUCCIÓN

Cualquier actividad de evaluación de la calidad en un laboratorio clínico debe iniciarse con la pregunta de qué es lo que se quiere mejorar. Así es como se puede identificar una oportunidad de mejora.

Una oportunidad de mejora es cualquier situación en la que se observan diferencias que se pueden reducir entre lo óptimo y la realidad siendo posiblemente el paso más difícil encontrar cual es la situación correcta a abordar. Una vez encontrada, debe de trabajarse con la ayuda de una serie de herramientas para conseguir disminuir esta diferencia entre la situación óptima y la realidad.

En este capítulo se pretende describir las principales herramientas para facilitar la implementación de dichas mejoras en los laboratorios clínicos de manera que sea más fácil y eficaz abordar los posibles problemas que nos encontraremos en la práctica diaria de un laboratorio.

IDENTIFICACIÓN Y PRIORIZACIÓN DE OPORTUNIDAD DE MEJORA

La parte más complicada del ciclo de mejora es su comienzo, es decir, encontrar una buena oportunidad de mejora en la que podamos trabajar. Estas oportunidades de mejora se identificarán más fácilmente si pensamos en servicios concretos y sus requisitos de calidad.

Es por ello que un requisito previo para seleccionar una oportunidad de mejora es que se trate de algo en los que somos protagonistas en nuestro servicio, de manera que tengamos una cierta capacidad de intervención.

Podemos clasificar los problemas de calidad en 4 tipos distintos, atendiendo a su naturaleza de proceso/resultado o estructurales/organizativos, y a su área de aplicación más genérica o específica (Figura 1).

Cada uno de manera individual y teniendo en cuenta las circunstancias debe de ser consciente y responsable de cuál es el problema que decide abordar, si bien la facilidad de análisis de los problemas específicos y de proceso/resultado generalmente va a resultar más simple que la de los problemas generales y estructurales, teniendo a su vez mayor probabilidad de éxito.

Así pues, podemos tener métodos cuantitativos y cualitativos. Si bien la identificación de problemas por métodos cuantitativos puede tener una mayor precisión, los métodos cualitativos no precisan de ninguna infraestructura previa y favorece el compromiso de los profesionales con la mejora. Ambos métodos pueden complementarse en función de las necesidades de la unidad (Figura 2).

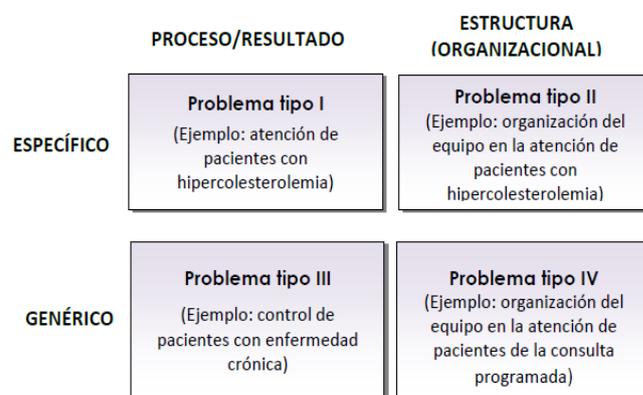


Figura 1. Clasificación de los problemas de calidad. Obtenido de: Saturno PJ: Diseño e implementación de intervenciones para mejorar. Manual del Máster en Gestión de la Calidad en los Servicios de Salud

MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE OPORTUNIDADES DE MEJORA QUE NO PRECISAN DATOS

En función de la experiencia que tengamos en la toma de decisiones en equipo, así como el grado de conclusión al que queramos llegar, elegiremos uno u otro, si bien debemos tener en cuenta que se pueden complementar entre ellos.

- **La lluvia de ideas (*Brainstorming*):**

La lluvia de ideas favorece la creatividad y la identificación de una gran cantidad de oportunidades de mejora.

Esta será la técnica de elección cuando no tengamos mucha experiencia previa en la toma de decisiones grupales. No obstante, el grado de conclusión de las ideas que surjan no será tan alto como el de otros métodos de manera que se deberá complementar con técnicas de priorización de problemas como la matriz decisional o la técnica del grupo nominal que veremos más adelante. Enemos también el problema de que los resultados pueden estar sesgados, ya que se manifestarán los problemas que aporten los miembros del grupo con más participación, quedando ocultas aquellas ideas de los miembros del grupo más introvertidos.

Las normas para desarrollar esta metodología están listadas en la Figura 3.

1. **Métodos que no requieren datos**
 - 1.1. Lluvia de ideas (*brainstorming*).
 - 1.2. Técnica de grupo nominal.
 - 1.3. Matriz decisional.
 - 1.4. Comparación por pares.
 - 1.5. Comunicación de incidencias.
2. **Métodos que requieren datos**
 - 2.1. Micromuestreo.
 - 2.2. Monitorización de indicadores.
 - 2.3. Análisis de perfiles estadísticos.
 - 2.4. La participación del usuario.

Figura 2. Herramientas para la identificación de oportunidades de mejora. Obtenido de: Saturno PJ: Diseño e implementación de intervenciones para mejorar. Manual del Máster en Gestión de la Calidad en los Servicios de Salud

- **Técnica del grupo nominal**

Esta técnica es especialmente interesante cuando los participantes tienen cierta experiencia sobre el tema planteado, el grupo no es muy heterogéneo y tiene un tamaño inferior a 10 personas.

La técnica del grupo nominal favorece la participación paritaria de todo el grupo en la identificación de oportunidades de mejora. Además, permite alcanzar una gran validez en las decisiones a tomar a la vez que consigue evitar conflictos despersonalizando la confrontación entre los desacuerdos.

Su desarrollo consta de los siguientes pasos:

- Generación de ideas de forma individual. Cada miembro que participa en el ciclo de mejora puede escribir sus ideas en un papel sin intercambiar información entre ellos. Para que sea más operativo se puede limitar el número de propuestas por individuo a tres.
- Registro del listado de oportunidades de mejora individual. Cada participante expondrá su problema de manera individual.
- A continuación, se juntan todas las ideas ya que es probable que algunas de ellas se hayan repetido.
- Se clarifican las ideas al resto del grupo, definiéndolas en base a lo que tenemos y a lo que nos gustaría tener.

- Priorización individual de las ideas (votación preliminar). En esta fase se otorgará de manera individual sin discusión de grupo ni presión por los compañeros una puntuación a cada una de las ideas surgidas en las fases anteriores. Una forma simple de hacer esto es asignar de 0 a 5 puntos cada problema repartiendo un número de votos fijos entre todos ellos.
- Discusión de voto preliminar, donde cada participante explica la puntuación que ha dado a cada idea y el motivo de esta. El grupo puede debatir.
- Voto final. El problema u oportunidad de mejora más votado será elegido por el grupo para su evaluación y mejora.

Así todo el grupo realizará aportaciones expresándose también las ideas minoritarias que quedarían ocultas en discusiones abiertas.

1. Exposición del objetivo de la reunión por parte del moderador.
2. Recordar las reglas del método: no criticar las ideas propuestas.
3. Planteamiento, por parte del animador, de un ejemplo que puede parecer banal, pero que favorece un ambiente distendido y la generación de ideas.
4. Exposición, por cada participante, de una sola idea a la vez cuando considere oportuno y sin limitación en su número.

Figura 3. Normas para moderar una reunión de lluvia de ideas. Obtenido de: Saturno PJ: Diseño e implementación de intervenciones para mejorar. Manual del Máster en Gestión de la Calidad en los Servicios de Salud

- **La comparación por pares**

Con este método podemos concentrarnos en un máximo de dos problemas simultáneamente, comparando ambos y eligiendo el más importante de ellos. Los criterios de priorización son implícitos y subjetivos y es un método más complejo.

- **La matriz decisional de criterios múltiples o parrilla de análisis**

Esta metodología tiene dos modalidades en función de si los criterios empleados se consideran igual de importantes o están jerarquizados.

Para la primera de ellas se realiza una matriz donde se incluyen los distintos problemas en la primera columna y en la primera fila los criterios a evaluar, analizándose cada uno de ellos de manera separada. Finalmente se contabilizan todas las puntuaciones de los distintos criterios y se ordenan en función de la puntuación alcanzada (Tabla 1).

En el segundo caso, previa jerarquización de los criterios, se diseña un gráfico con respuestas “si/no” en forma de árbol que servirá para clasificar las oportunidades de mejora en función de su importancia, dándole más peso al primer criterio, y menos al último. Aquella oportunidad de mejora que responda con “si” a todos los criterios se clasificará con prioridad 1º. En la Figura 4 se muestra este árbol clasificatorio.

La matriz decisional puede combinarse con técnicas de búsqueda de oportunidades de mejora como la lluvia de ideas o el grupo nominal visto anteriormente, ya que permite priorizar de una manera rápida y eficiente las oportunidades que surgen en dichos métodos.

MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE OPORTUNIDADES DE MEJORA UTILIZANDO DATOS

Estos métodos están condicionados a la cantidad y calidad de las diferentes fuentes de información que puedan aportar datos. Técnicas como el micromuestreo o la participación del usuario pueden identificar una gran variedad de oportunidades de mejora, pero la monitorización y al análisis de perfiles se focalizan en aspectos asistenciales. A continuación, detallamos los siguientes métodos:

- **Micromuestreo de registros**

Este método requiere que se registren datos de actividad asistencial, como historias clínicas, estadísticas de analíticas de pacientes, etc. En ese caso, podemos hacer un micromuestreo (unos 15 o 20 por ejemplo), para detectar áreas potencialmente problemáticas.

Para aumentar la validez de este método se suele revisar cada registro por dos profesionales con experiencia en la materia, resumiendo sus conclusiones y viendo si existe alguna incongruencia entre ellos.

Pueden buscarse problemas genéricos (ej: cantidad de pruebas que se solicitan en Atención Primaria) o más específicos (tiempo que transcurre entre la solicitud de PCT en pacientes de la unidad de reanimación y el análisis de la muestra).

CRITERIOS DE DECISIÓN. Máximo 5 Mínimo 1.					
PROBLEMA	¿Afecta a muchos pacientes?	¿Supone un riesgo grave para la salud?	¿Dependencia interna de la posible solución?	¿Es una solución barata?	Total
1- Tiempo de respuesta de los LCR	+++	+++++	+++++	+++++	18
2- Falta de comunicación en el pase de guardia	+++	+++	+++++	+++++	16
3- Fallos en el sistema informático	+++++	+++	+	+	10
4- Falta de reactivo	+++++	+++++	+++	+++++	18
5- <i>Burning</i> del personal técnico	++	++	++++	+++++	13

Tabla 1. Matriz decisional para priorizar oportunidades de mejora. Elaboración propia

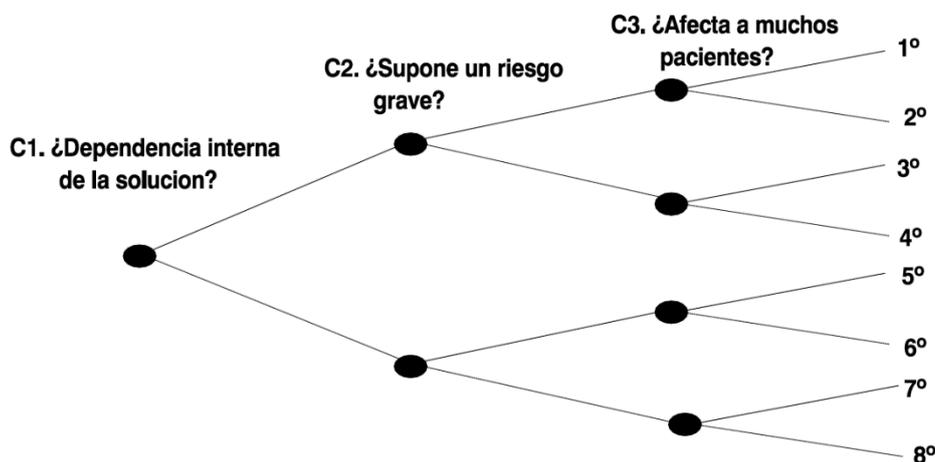


Figura 4. Matriz de priorización de oportunidades de mejora jerarquizadas por criterios (C1>C2>C3). Obtenido de: Saturno PJ: Diseño e implementación de intervenciones para mejorar. Manual del Máster en Gestión de la Calidad en los Servicios de Salud

- **Monitorización de indicadores**

Los sistemas de monitorización de la calidad tienen como objetivo principal identificar problemas de calidad. Así pues, si disponemos de una diversa batería de indicadores (de eficacia, proceso, analíticos, preanalíticos y postanalíticos) podemos encontrar problemas relacionados con esa área en concreto.

- **Análisis de perfiles**

Esta metodología solo se puede usar cuando se mide un mismo indicador por distintos proveedores (facultativos especialistas, facultativos de atención primaria, clínicos, unidades de electromedicina, etc.).

Cuando algún proveedor presenta una desviación de la media con respecto a los demás es significativo de un área de mejora en la que se debe trabajar y analizar la causa del posible problema que lo esté provocando.

Un ejemplo sería monitorizar las solicitudes de alguna prueba de laboratorio por diferentes centros de salud, y analizar si en alguno de ellos la solicitud de pruebas difiere de la media y el motivo de ello (Figura 5).

- **Participación del usuario en la identificación de problemas**

Los pacientes y los clientes internos del laboratorio son los “destinatarios” finales del producto que se ofrece. Es por ello que juegan un papel importante en la identificación de problemas de calidad en aspectos relacionados con el incumplimiento de sus expectativas, a la vez que pueden ofrecer información muy importante para identificar oportunidades de mejora en procesos asistenciales que de otra manera se nos escaparían.

Las principales herramientas para la obtención de esta información son:

Análisis de quejas y reclamaciones:

Los libros de reclamaciones son la herramienta clásica para la identificación de problemas, aunque muchas personas pueden verlo como un sistema principalmente punitivo.

La cantidad de reclamaciones que tenemos en nuestros servicios y la clasificación de las mismas puede aportar información acerca de si alguna actividad asistencial precisa de una mejora en su procedimiento. La información que hay en ellas debe de ser valorada con cautela para que no nos lleven a falsas interpretaciones, ya que lo que ve el usuario puede ser tan solo la punta del iceberg de un problema mayor.

Encuestas de satisfacción:

En general es una fuente de información más adecuada para sacar a la luz problemas sobre el trato recibido, el contexto en el que se desarrolla la asistencia y los problemas de tipo organizacional.

Tiene ciertas ventajas con respecto al análisis de quejas ya que, si la encuesta la construimos metodológicamente bien, podemos identificar una mayor cantidad de problemas. Otra

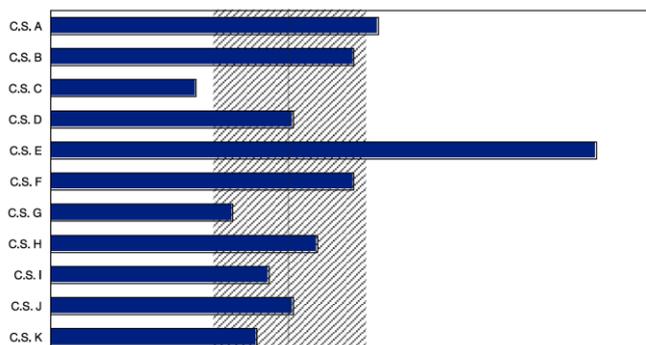


Figura 5. Análisis de perfiles de la solicitud de una prueba de laboratorio en diferentes centros de salud. Adaptado de: Saturno PJ: Diseño e implementación de intervenciones para mejorar. Manual del Máster en Gestión de la Calidad en los Servicios de Salud

ventaja es que refleja una muestra representativa de usuarios (ya sean pacientes o clientes internos), evitando el sesgo que podemos encontrar en el análisis de quejas donde solo se manifiesta la opinión de usuarios insatisfechos.

El informe del usuario:

Se puede usar de forma complementaria o sustitutiva al micromuestreo. Se puede realizar haciendo preguntas a usuarios de nuestros productos de manera aleatoria (¿Le han explicado al entrar en la sala de extracciones que si solo va a entregar orina no tiene por qué esperar turno?, ¿Le ha explicado su médico que para realizar la prueba del cortisol tiene que venir antes de las 9 A.M.?).

La principal ventaja de este método consiste en revelar problemas asistenciales que difícilmente salen a la luz con otros métodos siendo en oca ocasiones una manera más eficaz de recopilar datos.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Delbecq AL, van de Ven AH, Gustafson DH. Técnicas grupales para la planeación. México, DF: Trillas; 1984.
- Palmer RH. Evaluación de la asistencia ambulatoria: Principios y práctica. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 1990. Cap 7.
- Pineault R, Daveluy C. La planificación sanitaria: Conceptos, métodos, estrategias. Barcelona: Masson,1987. Cap. 3
- Sannazaro PJ, Mills DH. A critique of the use of generic screening in quality assessment. JAMA, 1991;265:1977-81.
- Saturno PJ. Los métodos de participación del usuario en la evaluación y mejora de la calidad de los servicios sanitarios. Rev Esp Salud Pública. 1995;69:163-75.
- Saturno PJ. Monitorización del uso de medicamentos para mejorar la calidad de la prescripción: problemas, métodos e indicadores. Aten Primaria. 1996;18(6):331-8.
- Saturno PJ: Diseño e implementación de intervenciones para mejorar. Manual del Máster en Gestión de la Calidad en los Servicios de Salud. Módulo 3: Actividades básicas para la mejora continua: Métodos y herramientas para la realización de ciclos de mejora. Unidad Temática 17. Universidad de Murcia, 1ª Ed. Universidad de Murcia, 2008. ISBN: 978-84-8371-754-7. Depósito legal: MU-1655-2008.

APLICACIÓN DE UN CICLO DE MEJORA PARA LA GESTIÓN AUTOMATIZADA DE MUESTRAS DE HEMÓLISIS EN UN LABORATORIO CLÍNICO

Autores: Daniel Párraga García, Laura Parés Pollán

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital 12 de Octubre, Madrid

Palabras Clave: Ciclo de mejora, Hemólisis, Informe de laboratorio

INTRODUCCIÓN

• Naturaleza y severidad del problema

El objetivo del laboratorio clínico es informar el verdadero valor de una concentración o actividad. Sin embargo, los resultados se ven a menudo afectados por factores interferentes relacionados con la presencia de hemoglobina, bilirrubina y lipemia, que pueden ser reconocidas por el aspecto de la muestra, su color o turbidez^{1,2,3}. Es complicado predecir el efecto de la hemólisis, turbidez e hiperbilirrubinemia por la necesidad de que cada muestra debe de ser analizada visualmente inmediatamente después de su centrifugación.

Para concentraciones de hemoglobina superiores a 300mg/L (18,8 mmol/L), la hemólisis se puede apreciar a simple vista, si bien para valores inferiores no es tan fácil² (Figura 1). Las muestras hemolizadas en el laboratorio tienen una prevalencia del 3,3%, siendo responsables del rechazo de casi el 60% de las peticiones analíticas solicitadas⁴. La hemólisis puede ocurrir in vivo o in vitro, siendo la mayoría de las muestras hemolizadas (>95%) atribuibles a procesos in vitro resultantes de la incorrecta obtención o transporte de la muestra^{5,6}.

La hemólisis es la interferencia visible que con mayor frecuencia afecta a las 20 principales pruebas de química clínica. Por otra parte, las pruebas enzimáticas no suelen verse afectados. La hemólisis tiene un marcado efecto en los constituyentes que están presentes en mayor concentración en el plasma que dentro de los eritrocitos. Por otro lado, la hemoglobina también puede interferir directamente en la medición colorimétrica de los constituyentes al tener un espectro de absorción que comienza sobre los 340 nm (pese a que su banda característica está entre 500 y 600 nm), afectando de esta manera a la concentración o actividad de los constituyentes medidos en este intervalo de longitud de onda^{5,6}.

Gracias a la determinación de los índices séricos el laboratorio clínico puede controlar estas citadas interferencias sin la pérdida de tiempo que supondría su visualización manual.

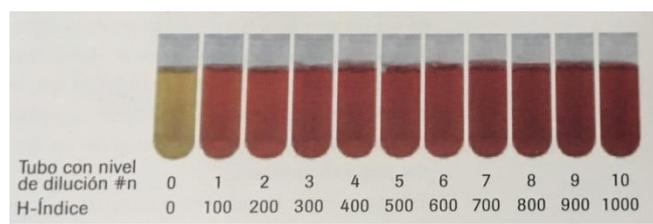


Figura 1. Concentraciones crecientes de hemólisis.
Elaboración propia

La interferencia por hemólisis es un problema real al que se enfrentan los laboratorios clínicos. Con la creciente demanda de peticiones analíticas la gestión de este tipo de interferencias de forma manual se hace cada vez más laboriosa. Es trabajo del laboratorio clínico el manejar adecuadamente este tipo de interferencias e informar de los resultados analíticos a los médicos solicitantes de la manera más clara y precisa.

Un error de laboratorio puede definirse como "cualquier efecto negativo o potencial sobre el manejo del paciente", de forma que los informes de laboratorio pueden repercutir en la toma de decisiones clínicas para el paciente. Es por ello que el laboratorio está sometido a un control de calidad garantizado por las autoridades regulatorias y por procedimientos de certificación (ISO 9001) y acreditación (ISO 15189)⁷.

Es de vital importancia que a la hora de la interpretación de los resultados interferidos por hemólisis no haya ningún tipo de duda sobre cómo actuar. El clínico puede tomar decisiones diferentes en función de dicha interpretación, por ello se hace imprescindible buscar una serie de criterios que controlen la manera de informar estos resultados de forma homogénea y sistemática cada vez que el laboratorio detecte una de las citadas interferencias.

Por otro lado, cada parámetro de laboratorio tiene sus peculiaridades y se verá interferido a diferentes concentraciones de interferente. La gestión manual de este tipo de interferencias se hace muy tediosa por el alto volumen de muestras que recibe nuestro hospital (hospital de nivel 3), por lo que se considera el empleo de reglas programadas en el sistema informático de laboratorio para facilitar la gestión de las interferencias.

• Objetivos

Evaluar y mejorar la calidad en el informe de laboratorio gestionando las interferencias por hemólisis, a través de la realización de un ciclo de evaluación y mejora de la calidad que surge de un problema derivado de una no conformidad hallada en la auditoría externa de la autoridad reguladora (ENAC).

IDENTIFICACIÓN Y PRIORIZACIÓN DE OPORTUNIDADES DE MEJORA

Se aplica la técnica de grupo nominal⁸ para la identificación de oportunidades de mejora. Esta técnica está recomendada cuando los participantes tienen cierta experiencia sobre el tema y el grupo no es mayor a 10 personas. En este caso solo participaron 4 personas: el Responsable de Calidad del Servicio, el responsable de la Gestión del Sistema Informático de Laboratorio (S.I.L), el Jefe de Sección del Laboratorio Core 24 horas y el Jefe de Servicio.

Su desarrollo consta de 6 pasos divididos en dos bloques, uno para identificar las oportunidades de mejora y otro para priorizarlas. Vemos los tres primeros apartados a continuación:

- **Generación de ideas de forma individual**

Una vez planteada de forma escrita, concreta y sin ambigüedades el problema derivado de la no conformidad de la auditoría externa que deriva en una posible oportunidad de mejora, cada miembro que participa en el ciclo de mejora piensa y/o escribe sobre un papel sus propuestas, sin intercambiar información con ningún otro miembro del equipo.

- **Registro del listado de oportunidades de mejora individual**

Posteriormente se exponen todas las ideas por turno de intervención y se registran en una lista, definiéndolas en base a lo que tenemos y a lo que nos gustaría tener:

1. No existen reglas informáticas para controlar de forma automatizada los resultados por interferencia de hemólisis. Se busca: establecer reglas automatizadas.

2. Los equipos de bioquímica no descartan las muestras no aptas de forma automática pese a tener un módulo específico para ello inactivo. Se busca: Rechazo automático por parte del equipo de muestras con valores extremos de hemólisis e ictericia.

3. Los equipos de hematología no rechazan las muestras hemolizadas de forma automática. Se busca: Rechazo automático de pruebas no aptas.

4. No hay homogeneidad en el informe de laboratorio a la hora de establecer comentarios referentes a muestras interferidas por hemólisis, quedando a criterio del facultativo responsable en cada momento la redacción o no de dicho comentario y la forma de realizarlo. Se busca: Normalizar la forma de emisión de comentarios en el informe con respecto a las interferencias por hemólisis.

5. Los resultados de los índices de hemólisis (IH), ictericia (I) y lipemia (L) se emiten en el informe, lo que disminuye la claridad de estos pudiendo generar confusión al clínico en la interpretación de los resultados. Se busca: Eliminar la emisión de los índices séricos en el informe.

- **Clarificación de las ideas**

Las oportunidades de mejora identificadas en el listado común fueron sometidas a discusión para concretar o matizar significados y evitar duplicidades. Para la selección de oportunidades de mejora se consideró tanto la factibilidad de su resolución como las características intrínsecas del problema. Se consideraron los problemas específicos y relacionados con los procesos y actividades de los que somos proveedores.

Se unifican las oportunidades de mejora 1, 4 y 5 al considerarse que el problema tiene un origen común. Posteriormente, se volvió a elaborar un listado común con 3 oportunidades de mejora:

1. Programar reglas informáticas para mejorar la calidad del informe: eliminando los índices séricos y poniendo comentarios automatizados y personalizados para cada parámetro que esté interferido por la hemólisis.

2. Rechazo automático por parte del equipo de muestras con valores extremos de hemólisis e ictericia.

3. Rechazo automático de pruebas no aptas por los equipos de hematología.

Para la priorización de las oportunidades de mejora se empleó el método “matriz decisional de criterios múltiples o parrilla de análisis⁹”.

Para ello, se aplicaron de manera explícita unos criterios de valoración establecidos según las indicaciones de la *Joint Commission on Accreditation of Health Care Organization* (frecuencia, alto riesgo para los usuarios, dependencia interna de la solución, coste). Los criterios empleados se consideraron igual de importantes.

La forma de evaluar las oportunidades de mejora fue dar una puntuación de 5 a 1 para cada problema de forma individual (máximo: 5 y mínimo: 1). Posteriormente se hizo la media obtenida de las puntuaciones individuales redondeándose a números enteros. En la Tabla 1 se muestra un ejemplo cumplimentado de la plantilla empleada.

CRITERIOS DE DECISIÓN. Máximo 5 Mínimo 1.					
PROBLEMA	¿Afecta a muchos pacientes?	¿Supone un riesgo grave para la salud?	¿Dependencia interna de la posible solución?	¿Es una solución barata?	TOTAL
1.Reglas informáticas	+++++	++++	+++++	+++++	19
2.Equipos de Bioquímica	++++	++++	+++	++	13
3. Equipos de Hematología	++++	++++	+	+	10

Tabla 1. Ejemplo de matriz decisional. Elaboración propia

• Discusión del voto preliminar

Cada miembro del equipo da su opinión cumplimentando la matriz decisional. Se contabilizan todos los puntos, se comentan con el grupo y finalmente se obtiene la tabla definitiva de priorización de oportunidades de mejora (Tabla 2).

CRITERIOS DE DECISIÓN. Máximo 5 Mínimo 1.					
PROBLEMA	¿Afecta a muchos pacientes?	¿Supone un riesgo grave para la salud?	¿Dependencia interna de la posible solución?	¿Es una solución barata?	TOTAL
1.Reglas informáticas	20	16	20	20	76
2.Rechazo muestras Bioquímica	16	15	12	6	49
3. Rechazo muestras equipos de Hematología	16	16	4	4	40

Tabla 2. Matriz decisional de las oportunidades de mejora identificadas y priorizadas con los criterios de valoración.
Elaboración propia

• Voto final

Tras la discusión se decide actuar en el problema 1 ya que fue el que mayor puntuación obtuvo.

Se descarta para un primer ciclo el problema 2, ya que se entiende que con la correcta implantación de la oportunidad descrita en el problema 1 el problema quedará subsanado, siendo el segundo más fácil de implementar tanto a nivel de dependencia interna como económico a corto plazo. No obstante, se contemplará como futura oportunidad de mejora, ya que podría adecuar la realización de pruebas que no deberían de realizarse, de forma que supondría un ahorro de recursos (menor gasto de reactivos) a largo plazo.

Se descarta para un primer ciclo el problema 3 por ser de poca dependencia interna. En el momento presente, la hemólisis en pruebas de coagulación se detecta visualmente y se informa. Además, en breve llegarán equipos nuevos de coagulación capaces de aportar esta información. Estos equipos realizan una medición de la absorbancia óptica de la muestra diluida a tres longitudes de onda distintas (405, 535 y 671 nm).

FLUJOGRAMA

Puesto que la oportunidad de mejora identificada implicaba la correcta organización y ejecución de tareas secuenciales a lo largo del tiempo, se utilizó un flujograma para identificar las contingencias o situaciones/causas potencialmente problemáticas cuya frecuencia era necesario medir (Figura 2).

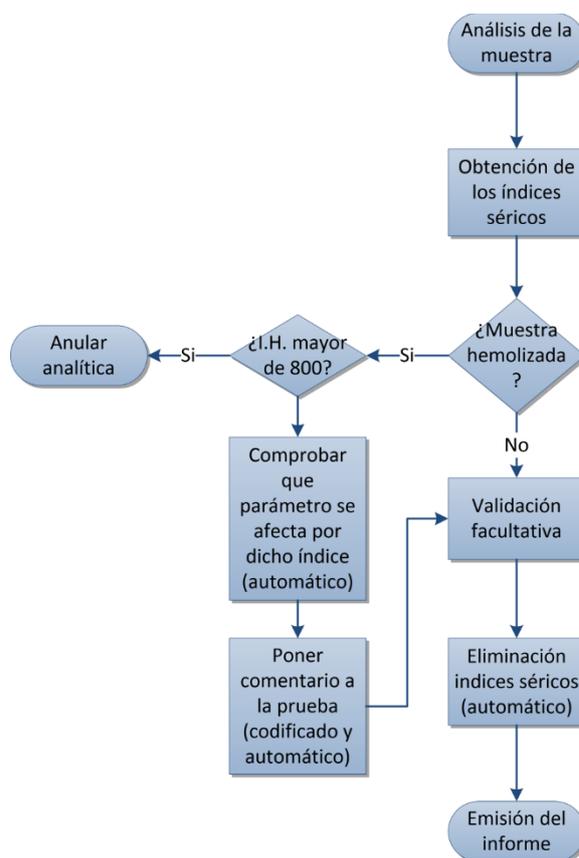


Figura 2. Flujograma para identificar las contingencias o situaciones/causas potencialmente problemáticas de la oportunidad de mejora: "Mejora de calidad del informe de laboratorio". Elaboración propia

CRITERIOS PARA EVALUAR LA CALIDAD DE LAS OPORTUNIDADES DE MEJORA SELECCIONADAS:

• Construcción de criterios

Se elaboraron criterios válidos y fiables con los que medir la calidad del servicio o aspecto del servicio a evaluar en la situación de partida y que posteriormente serían empleados para documentar la mejora conseguida^{10,11}.

A continuación, se describen los criterios seleccionados para evaluar la calidad del problema "Mejora de calidad del informe de laboratorio", las excepciones a los mismos y las correspondientes aclaraciones (descripciones inequívocas de cualquier término que aparezca en el criterio o sus excepciones y que pueda estar sujeto a interpretación):

1. El informe analítico con un índice de hemólisis ≥ 800 debe ser anulado
2. Informe analítico con parámetros interferidos por hemólisis (por índices entre 15 y 799) debe especificar comentarios de tal interferencia.

En la Figura 3 se muestran los valores de hemólisis que causan interferencia desglosada por parámetro analítico.

PRUEBAS REGLA COMENTARIO	IH INSERT
ALT	90
LDH	15
AST	40
CK	100
Potasio	90
Troponina T hs	100
GGT	200
Hierro	200
Amilasa	500
Acetaminofeno	150
Etanol	200
Fosfatasa alcalina	200
Fósforo	300
Valproato	500
Factor reumatoide	300
Ferritina	500
Bilirrubina directa	25
Testosterona	600
Cortisol	500
TG	600
Vitamina D	600
DHEA-S	560
BCROSS	500
aTSHR	400
Bilirrubina total	800
Colesterol total	700
Colinesterasa	700
Magnesio	800
PIGF	500
sFLT-1	500
Triglicéridos	700

PRUEBAS REGLA ELIMINAR	IH para eliminar
AST	150
Etanol	600
Fósforo	600
LDH	150
Potasio	300
Troponina T hs	600
Folato	30
Insulina	50
NSE	40
Osteocalcina	150
PEPTIDO C	300
PTH	60
Hierro	600
Bilirrubina directa	75
Acetaminofeno	450

Figura 3. Pruebas de laboratorio interferidas por hemólisis y pruebas de laboratorio rechazadas por hemólisis.
Elaboración propia

IDENTIFICACIÓN Y MUESTREO DE LOS CASOS

Para la toma de datos, se utiliza como *marco muestral* a pacientes de cualquier origen peticionario que han solicitado una analítica durante el periodo de enero a junio de 2017.

Para el cálculo del *número de casos a evaluar (tamaño de la muestra)* se utilizan las herramientas de exportación de datos del laboratorio, usándose la totalidad del marco muestral para evaluar el cumplimiento de los criterios.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El coordinador del grupo que realizó la actividad (Responsable de Calidad del Laboratorio) planteó el problema de calidad a resolver (Mejora de la calidad del informe de laboratorio actuando sobre las interferencias por hemólisis y la no aparición de los índices séricos). Para ello, en base a los resultados obtenidos en la evaluación del nivel de calidad se preguntó por lo que se podría hacer para mejorar.

Se establecieron estrategias de intervención o líneas de acción dirigidas a los grupos de profesionales responsables de los criterios seleccionados.

RESULTADOS

- **Análisis y presentación de los datos de la evaluación inicial**

El Laboratorio Core 24 Horas procesa cada día entre 1500 y 2000 muestras de bioquímica, emitiendo un informe por cada petición solicitada. Durante el periodo estudiado previo a la implantación de las medidas de mejora (1 de enero de 2017 a 30 de junio de 2017), se evaluaron los siguientes resultados, donde se eliminan los informes que no contienen hemólisis o las peticiones que no han sido remitidas. Se muestran los datos en la Tabla 3.

Nº de peticiones con I.H.	0<I.H.>14	15<I.H.>799	I.H.>800
309398	235339	73944	115

Tabla 3. Evaluación inicial de los informes. Elaboración propia

La evaluación se realizó en todos los informes emitidos durante el periodo de estudio gracias a herramientas informáticas de exportación de datos, por lo que se conoce el cumplimiento "real" de los criterios (C), de forma que no es necesario calcular una estimación puntual del nivel de cumplimiento (P) con su respectivo intervalo de confianza (I.C.). Se muestran los datos obtenidos en la Tabla 4.

Criterio	Nº de cumplimientos	Tamaño de la muestra	Grado de cumplimiento real (C)
1-El informe analítico con un índice de hemólisis ≥ 800 debe ser anulado	97	115	84,44%
2-Informe analítico con parámetros interferidos por hemólisis (por índices entre 15 y 799) debe especificar comentarios de tal interferencia.	222	73944	0,28%

Tabla 4. Evaluación de cumplimiento real de los criterios. Elaboración propia

Como vemos el segundo criterio contiene las mayores tasas de defectos de calidad (incumplimientos), incumplándose en prácticamente la totalidad de los informes. Aunque se abordaron ambos criterios, se priorizaron los esfuerzos en solucionar este problema de calidad.

- **Intervenciones seleccionadas e implementadas**

Diagrama de afinidades

Tras el análisis de causa y efecto se vieron dos oportunidades de mejora en las cuales se podía intervenir directamente, al ser causas modificables evidenciadas científicamente con anterioridad cuantificadas. Por ello se procede a eliminar los índices séricos de los informes configurando el sistema informático de laboratorio.

Con respecto a los criterios priorizados, los esfuerzos deben de ir dirigidos principalmente al criterio 2: "Informes con algún valor interferido no informado o eliminado".

Los resultados obtenidos tras la evaluación descrita del diagrama de afinidades se observan en la Figura 4.

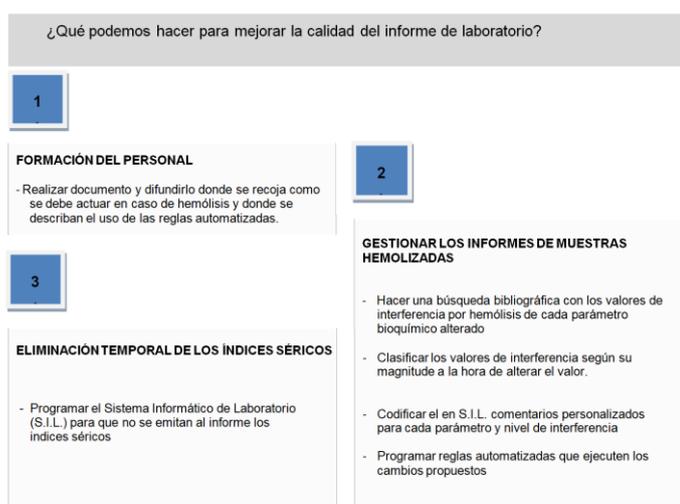


Figura 4. Diagrama de afinidades para el diseño de la intervención de mejora de calidad en el informe de laboratorio. Elaboración propia

Diagrama de Gantt: Para cada acción seleccionada se eligió un responsable y se registró un cronograma de las tareas a realizar. El periodo abarcado comprende desde el 15 de Agosto de 2017 al 31 de Septiembre de 2017 (Tabla 5).

El diagrama de Gantt permite establecer líneas estratégicas que tienen como objetivo promover la efectividad del cambio para mejorar la calidad en el informe de laboratorio.

- **Resultados de la reevaluación**

Una vez implementados todos los cambios o intervención de mejora, siguiendo el cronograma, se procedió a una reevaluación del nivel calidad del informe de laboratorio. El marco temporal el que va de 1 de Octubre 2017 a 30 de marzo de 2018, se evaluaron los resultados en la Tabla 6.

Nº de peticiones con I.H.	0<I.H.>14	15<I.H.>799	I.H.>800
309062	234765	74176	121

Tabla 6. Análisis de calidad del informe del laboratorio. Elaboración propia

TAREAS	RESPONSABLES	1	2	3	4	5	6
1- Búsqueda bibliográfica de los valores interferidos por hemólisis	Residentes	-					
2-Codificación en el S.I.L de los comentarios	Facultativo área de informática		-				
3-Clasificar valores hemólisis por orden de magnitud	Facultativo de Calidad			-			
4- Programar reglas automatizadas para la hemólisis y eliminar índices séricos	Facultativo área de informática				-		
6- Informar a los facultativos del servicio del cambio	Jefe de sección Core 24 horas					-	
7- Informar al resto de servicios de los cambios	Jefe de Servicio						-

Tabla 5. Diagrama de Gantt para la intervención de la mejora de calidad del informe de laboratorio. Elaboración propia

Estimación del grado de cumplimiento de los criterios reevaluados

La evaluación se realizó en todos los informes emitidos durante el periodo de estudio gracias a herramientas informáticas de exportación de datos, por lo que se conoce el cumplimiento "real" de los criterios (C), de forma que no es necesario calcular una estimación puntual del nivel de cumplimiento (P) con su respectivo intervalo de confianza (I.C.).

Para el análisis de los defectos se utilizó la totalidad de las peticiones solicitadas, siendo el volumen total de informes analizados muy similar en ambas evaluaciones (309062 frente a 309398). Se muestran los resultados en la Tabla 7.

Criterio	Nº de cumplimientos	Tamaño de la muestra	Grado de cumplimiento real (C)
El informe analítico con un índice de hemólisis ≥ 800 debe ser anulado	121	121	100%
Informe analítico con parámetros interferidos por hemólisis (por índices entre 15 y 799) debe especificar comentarios de tal interferencia.	74176	74176	100%

Tabla 7. Análisis de los defectos. Elaboración propia

No se encuentra ningún incumplimiento por lo que las reglas de automatización y la difusión del cambio a los facultativos ha mejorado el nivel de calidad del informe.

Datos comparativos entre ambas evaluaciones

Los datos de la reevaluación son presentados de forma numérica y gráfica para conocer el nivel de calidad logrado tras la intervención, la mejora conseguida y si ésta ha sido significativa en relación a la situación de partida, la mejora relativa en cada uno de los criterios medidos y los pasos a seguir en relación al problema de calidad evaluado.

	1ª Evaluación	2ª Evaluación	Mejora absoluta	Mejora relativa
CRITERIO	C1 (%)	C2 (%)	C2 - C1	$(C2 - C1) / (100 - C1)$
1-El informe analítico con un índice de hemólisis ≥ 800 debe ser anulado	84,44	100	15,56	100%
2-Informe analítico con parámetros interferidos por hemólisis (por índices entre 15 y 799) debe especificar comentarios de tal interferencia	0,28	100	99,72	100%

Tabla 8. Análisis de ambas evaluaciones. Elaboración propia

Se estima la mejora conseguida (absoluta y relativa), siendo innecesario el cálculo del grado de significación estadística de la mejora observada al haber trabajado con todos los informes evaluados y no una muestra de los mismos¹². En la Tabla 8 se exponen los datos del análisis de ambas evaluaciones.

Tras la reevaluación, se objetivaron mejoras significativas en los niveles de cumplimiento de ambos criterios.

En consecuencia, se puede asegurar que la estrategia de mejora seguida a partir de los defectos de la primera evaluación ha funcionado correctamente.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

- Sociedad Española de Química Clínica. Comisión efectos de los medicamentos en química clínica. Estudio de las interferencias analíticas endógenas en química clínica. *Quim Clin.* 1994;13:84-92.
- Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analysis. *Clin Chem.* 1994;40:1996-2005.
- Carraro P, Servidio G, Plebani M. Hemolysed specimens: a reason for rejection or a clinical challenge? *Clin Chem.* 2000;46:306-7.
- Jones BA, Calam RR, Howanitz PJ. Chemistry specimen acceptability. A College of American Pathologists Q-Probes study of 453 laboratories. *Arch Pathol Lab Med.* 1997;121:19-26
- Sonntag O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1986; 24:127-39.
- Kaplan L, Pesce A. Interferencias en el análisis espectral. En: Kaplan L, Pesce A, dir. *Química Clínica, teoría, análisis y correlación.* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1988. p. 1163-76.
- Asociación Española de Normalización. *Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia.* (ISO 15189:2013, versión corregida 2014-08-15). Madrid: UNE; 2014.
- Saturno PJ, Gascón JJ. Identificación y priorización de oportunidades de mejora. Manual del Máster en gestión de la calidad en los servicios de salud. Módulo 3: Actividades básicas para la mejora continua: Métodos y herramientas para la realización de ciclos de mejora. Unidad Temática 10. Murcia: Universidad de Murcia; 2008.
- Saturno PJ. Diagnóstico organizacional. Estrategias de Implementación de los Programa Internos, Ciclo de Mejora de la Calidad. Manual del Máster en gestión de la calidad en los servicios de salud. Módulo 1: Conceptos básicos. Unidad temática 9. Murcia: Universidad de Murcia; 2008.
- Saturno PJ, Antón JJ, Santiago MC. La construcción de criterios para evaluar la calidad. Manual del Máster en Gestión de la Calidad en los Servicios de Salud. Módulo 3: Actividades básicas para la mejora continua: Métodos y herramientas para la realización de ciclos de mejora.

- Unidad Temática 12. Murcia: Universidad de Murcia; 2008.
11. Saturno PJ, Santiago MC, Antón JJ. Análisis de la fiabilidad de criterios. Manual del Máster en Gestión de la Calidad en los Servicios de Salud. Módulo 3: Actividades básicas para la mejora continua: Métodos y herramientas para la realización de ciclos de mejora. Unidad Temática 13. Murcia: Universidad de Murcia; 2008.
12. Saturno PJ. Reevaluación, análisis y presentación de resultados comparativos de dos evaluaciones. Manual del Máster en Gestión de la Calidad en los Servicios de Salud. Murcia: Universidad de Murcia; 2008.

BLOQUE II

SESIONES DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA

ANÁLISIS DE VARIANTES RARAS EN CÁNCER DE VEJIGA. UN ESTUDIO BASADO EN EXOMA

Autores: Alba Fernández del Pozo¹, Evangelina López de Maturana², Nuria Malats²

¹Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital 12 de octubre, Madrid

²Grupo de Epidemiología Genética y Molecular. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Palabras clave: Variante, Cáncer, Exoma

INTRODUCCIÓN

El cáncer de vejiga ocupa el primer lugar entre los carcinomas urinarios, representando el 50% del total de estas patologías. Se estima que hay 429.000 nuevos casos/año en todo el mundo lo que lo convierte en el 9º cáncer más común (Figura 1). En la Unión Europea (UE), se diagnostica a 124.000 personas/año. En 2030, la incidencia anual de este tipo de cáncer aumentará a 219.000 individuos.

En España, el cáncer de vejiga ocupa el quinto lugar entre los tumores más frecuentes diagnosticados en 2015, con 21.093 casos. El ratio hombre-mujer en España 4.8:1, es muy superior al que se da a nivel mundial 3.5:1.

- Algunos conceptos:
 - Un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base: adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G) de una secuencia del genoma.
 - Un alelo es cada una de las formas alternativas que puede tener una posición concreta. Cada par de alelos se ubica en igual locus o lugar del cromosoma.
 - MAF (*Minor Allele Frequency*) es la frecuencia del alelo menos común en un determinado locus, dentro de una población.
 - Variantes raras son aquellas que tienen la frecuencia del alelo menor (MAF) por debajo de 0.01-0.05. Podrían desempeñar un papel importante en la etiología de los rasgos complejos y

explicar la heredabilidad faltante, sin explicación por variantes comunes.

- El estudio de las variantes raras en cáncer de vejiga se debe a que:
 - Se ha descrito la agregación familiar, aunque no se identificó un alelo/gen de alta penetrancia.
 - Los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) han explorado la susceptibilidad genética al cáncer de vejiga y han identificado 24 loci distribuidos en 19 regiones de 14 cromosomas.
 - Sin embargo, dado que cada variante confiere muy poco riesgo individualmente, el % del riesgo familiar explicado por las variantes de GWAS es del 12%.
 - Las matrices de genotipado no capturan la variación genética debido a variantes raras.
- Principales factores de riesgo (Tabla 1):

Ambientales	Genéticos
Tabaco: [50%]	Ser pariente en primer grado de un paciente diagnosticado de cáncer de vejiga [x2]
Exposición Ocupacional (aminas aromáticas, hidrocarburos policíclicos) [20%]	Acetilador lento de la N-acetiltransferasa 2 (NAT2)
Dieta	Mutación en la Glutathion S-transferasa mu 1 (GSTM1)
Contaminación	

Tabla 1. Factores de riesgo en cáncer de vejiga. Elaboración propia

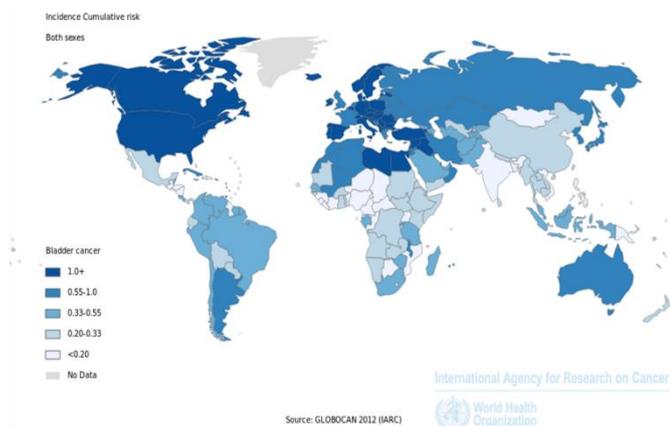


Figura 1. Incidencia global de cáncer de vejiga. Tomado de: Globocan 2012 (IARC)

Muchos estudios han determinado que fumar es el principal factor de riesgo para desarrollar cáncer de vejiga, con una fracción atribuible de aproximadamente el 50% de los casos, ya que existe una relación directa entre el desarrollo de cáncer de vejiga y el contenido de aminas aromáticas tales como B-naftilamina y los hidrocarburos aromáticos policíclicos del tabaco.

La exposición ocupacional a estas aminas e hidrocarburos aromáticos policíclicos es otro de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de cáncer de vejiga con hasta una fracción del 20% de los casos asociado con la exposición a estos componentes en áreas industriales. Además, hay otros factores menos determinantes como la dieta y la contaminación ambiental.

En cuanto a los factores genéticos, se ha encontrado que el riesgo de cáncer de vejiga es dos veces mayor en familiares de primer grado de pacientes previamente diagnosticados.

Los factores genéticos más relevantes en términos de conferir riesgo son los acetiladores lentos N-acetiltransferasa 2 (NAT2) y los genotipos glutatión S-transferasa mu 1 (GSTM1), factores de riesgo bien establecidos para cáncer de vejiga. Estas variantes confieren susceptibilidad individual a carcinógenos exógenos, principalmente los presentes en el tabaco, ya que ambas enzimas participan en la desintoxicación de dichos carcinógenos.

OBJETIVO

Explorar y comparar métodos de análisis de SNPs para evaluar la contribución de las variantes raras a la susceptibilidad genética de padecer cáncer de vejiga.

Algunos objetivos específicos son:

- 1) Identificar los métodos estadísticos actualmente disponibles para el análisis de asociación de variantes raras con riesgo.
- 2) Implementar estos métodos en datos reales (datos de secuenciación de exoma) para identificar variantes raras funcionales asociadas con cáncer de vejiga.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Estudio Epicuro

Los datos se obtuvieron del estudio SBC/EPICURO, un estudio retrospectivo de casos (1355) y controles (1270) realizado en 18 hospitales en cinco áreas españolas (Asturias, área metropolitana de Barcelona, Vallés, Alicante y Tenerife) durante los años 1998 a 2001.

Los criterios de inclusión para los casos fueron:

- Edad entre 21-80 años.

- Diagnóstico actual de carcinoma de células de la vejiga urinaria, confirmado histológicamente, y clasificado como tal por el sistema de 1998 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Sociedad Internacional de Patología Urológica

Los controles fueron pacientes ingresados en los hospitales participantes por otras patologías, cuyo diagnóstico no estaba relacionado con los factores de riesgo conocidos de cáncer de vejiga. Los controles se compararon con un caso para la edad (en categorías de 5 años), sexo, etnia y región.

Se solicitaron muestras de sangre para la extracción de ADN y se recopiló información sobre factores de riesgo (hábito de fumar, antecedentes de cáncer, antecedentes familiares de cáncer y exposición ambiental) mediante entrevistas personales realizadas por monitores capacitados.

Los sujetos también fueron categorizados de acuerdo con su hábito tabáquico en:

- Nunca fumadores.
- Fumadores de menos de 100 cigarrillos en su vida.
- Fumadores ocasionales.
- Fumador de al menos un cigarrillo por día durante menos de 6 meses.
- Exfumadores si hubieran fumado regularmente, pero hubieran dejado de fumar más de un año antes de la fecha de inclusión del estudio.
- Fumadores actuales, si hubieran fumado regularmente dentro del año posterior a la fecha de inclusión.

De todos los pacientes se seleccionaron aquellos con fenotipo extremo, para acentuar el componente genético en cáncer de vejiga, y asumiendo que las variantes raras eran enriquecidas entre estos casos.

Para los casos se seleccionaron aquellos pacientes <50 años, sin historia familiar de cáncer y no fumadores, que aun así presentaban la enfermedad, mientras que para los controles se seleccionaron a aquellos pacientes que a pesar de ser > 70 años, con historia familiar de cáncer y siendo fumadores empedernidos (más de 21 cigarrillos/día) no desarrollaban cáncer de vejiga.

Con estos criterios 104 pacientes (68 casos y 36 controles) se utilizaron en el análisis.

- Workflow (Figura 2)

Las muestras de ADN se secuenciaron utilizando el kit de enriquecimiento *Illumina TruSeq Exome* en la Universidad de Uppsala (Suecia). Las lecturas se alinearon con la secuencia de referencia humana (hg19) utilizando la herramienta *Burrows-Wheeler Aligner (BWA2)* y los archivos resultantes del mapa de alineación binaria (BAM) se utilizaron para denominar variantes de nucleótido único (SNV) en todas las muestras. Los archivos VCF generados se

procesaron luego en el Grupo de Epidemiología Genética y Molecular (GMEG) del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de España.

El procedimiento de control de calidad se aplicó tanto a nivel de muestra como a nivel de SNP para garantizar la calidad de los genotipos de SNP. Aquellos con mala calidad (SNP con profundidad de lectura <10 y aquellos que no pasaron las pruebas de calidad de secuencia se consideraron como faltantes, y luego se imputaron utilizando una estrategia de *pre-phasing* del conjunto de datos de destino implementado en el marco IMPUTE2 más SHAPEIT2 en el GMEG (CNIO). La imputación se realizó combinando las muestras con información de WES con el resto de individuos incluidos en el estudio SBC / EPICURO que fueron genotipados con la matriz 1M *Illumina*.

Finalmente se obtuvieron 93.867 SNPs o variantes raras (MAF <0.01) con buena calidad de imputación (info>0.3), que representan el 48.54% del número inicial de SNP. Estas se seleccionaron para los análisis de asociación basados en genes.

cuando son múltiples las variantes en el grupo asociadas con una enfermedad o rasgo dados.

Las pruebas de agregación implican dos pasos: primero, identificar todas las variantes raras dentro de una secuencia ó región (por ejemplo gen, región reguladora...) y luego probar los efectos acumulativos de variantes raras en regiones genéticas o conjuntos de SNP, como los genes.

En los últimos años se han propuesto numerosas pruebas de marcador múltiple basadas en regiones o genes (Tabla 2). Los más comúnmente utilizados son: las pruebas de carga (*Burden Test*), la prueba de asociación kernel de secuencias (*Sequence Kernel Association Test*) y las pruebas combinadas, que incluye SKAT-O (*Sequence Kernel Association Test-Optimized*)

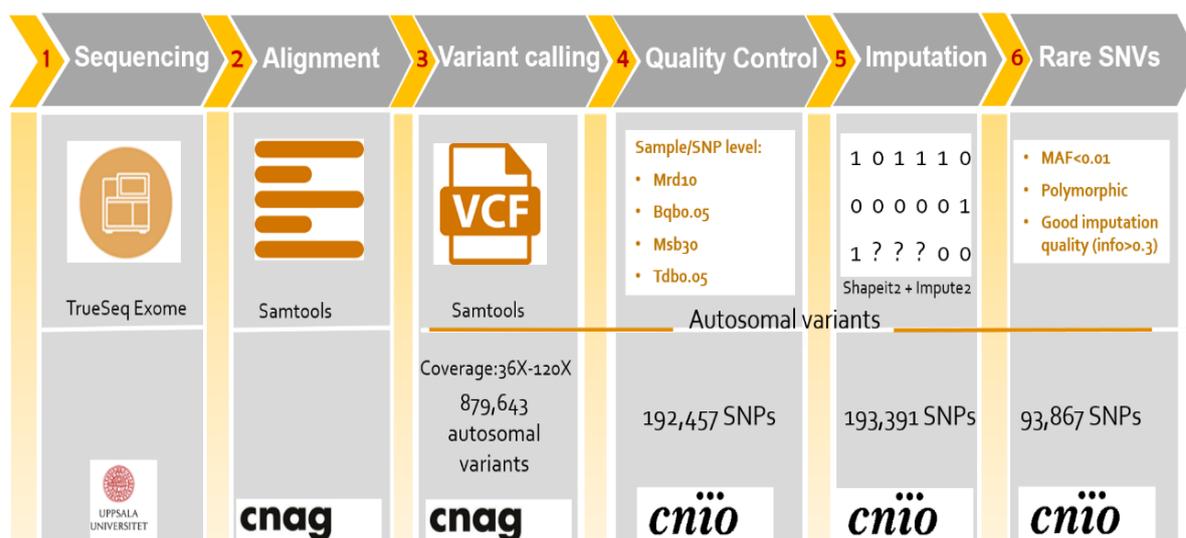


Figura 2. Workflow realizado para la obtención de variantes raras. Elaboración propia

Métodos Estadísticos

El enfoque más popular en GWAS es probar cada SNP individualmente y luego priorizar aquellos que cumplen con un nivel de significancia estricto (p <0.05) después de ajustar para múltiples pruebas. Sin embargo, el análisis individual de SNP en estudios variados raros tiene poco poder debido al MAF extremadamente bajo o a variantes poco frecuentes. En lugar de probar cada variante individualmente, recientemente se han desarrollado nuevos métodos estadísticos que comprenden pruebas de agregación. Evalúan los efectos acumulativos de múltiples variantes genéticas en un gen o región de interés, aumentando la potencia

	Descripción	Ventaja	Desventajas
Burden	Colapsa las variantes raras en scores genéticos	Aumenta su poder estadístico cuando una gran proporción de variantes son causales y los efectos van en la misma dirección	Pierde poder en presencia de variantes que aumenten o disminuyan el rasgo, o con un pequeño % de variantes causales

SKAT	Testea la varianza de los efectos genéticos	Tiene un gran poder estadístico en presencia de variantes que aumenten ó disminuyan el rasgo, o cuando existe una pequeña fracción de variantes causales	Es menos poderoso que <i>Burden test</i> cuando la mayoría de las variantes son causales y los efectos van en la misma dirección
SKAT-O	Es una combinación de <i>burden</i> con SKAT	Es más robusto respecto al porcentaje de variantes causales así como en presencia de variantes que aumenten/disminuyan los rasgos	Puede tener < poder estadístico que <i>burden</i> o SKAT si el nivel de computación es extenso

Tabla 2. Características de los distintos métodos estadísticos. Elaboración propia

• Implementación

Para la implementación de las pruebas estadísticas seleccionadas elegimos el paquete de software "SeqMeta", un paquete R para meta-análisis de pruebas basadas en regiones como SKAT, SKAT-O y prueba de carga (*burden test*) en el estudio de variantes raras.

El paquete puede acomodar resultados binarios para individuos no relacionados (casos/controles), como es nuestro caso, y proporciona funciones para análisis condicionales.

Para implementar cada prueba necesitábamos 2 pasos:

- 1) calcular estadísticos de resumen para cada estudio de secuenciación.
- 2) combinar las estadísticas de resumen para realizar pruebas de asociación de nivel de gen.

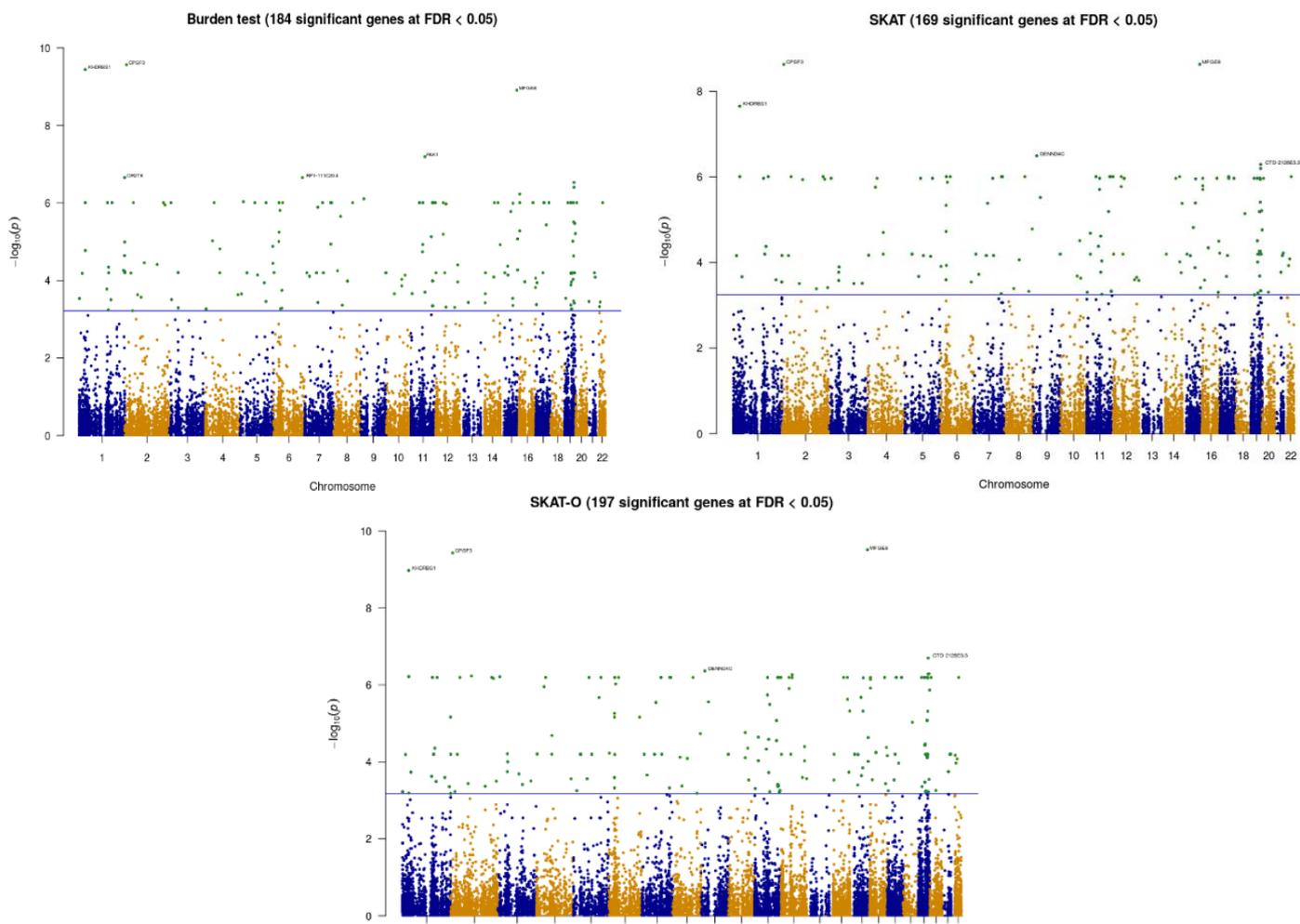


Figura 3. Diagrama de Manhattan para los distintos test estadísticos. Elaboración propia

RESULTADOS

• Genes

Una vez que se obtuvieron los valores p después de la aplicación de los diferentes métodos estadísticos, fue necesario aplicar una corrección de pruebas múltiples.

Se eligió el procedimiento Benjamini-Hochberg (B-H) para evitar errores de tipo I (falsos positivos).

Solo aquellos genes con un valor de p ajustado <0.05 fueron priorizados para análisis adicionales.

Se obtuvieron:

- 184 genes por *burden test*.
- 169 genes por SKAT.
- 197 genes por SKAT-O.

En las parcelas de GWAS Manhattan (Figura 3), las coordenadas genómicas (cromosomas del 1 al 22) se muestran a lo largo del eje X, con el logaritmo negativo de la asociación p -value para cada SNP en el eje Y, lo que significa que cada punto en el Manhattan la trama significa un SNP. Debido a que las asociaciones más fuertes tienen los valores p más pequeños (por ejemplo, 10^{-8}), sus logaritmos negativos serán los más grandes (por ejemplo, 8).

Debido a que se desconoce el verdadero modelo de enfermedad, decidimos priorizar aquellos genes que fueran significativos con los tres métodos. Para hacerlo, se utilizó el paquete VennDiagram de R (Figura 4).

Se obtuvo una buena superposición entre los resultados de las tres pruebas, con 119 genes identificados por los tres métodos.

SKAT y SKAT-O mostraron una superposición muy buena (solo SKAT-O detectó 4 genes y no se detectaron con SKAT-O, pero no con SKAT). Por otro lado, Burden y SKAT mostraron la peor superposición, ya que la prueba Burden identificó 41 genes que no fueron identificados por SKAT-O. La prueba de carga fue el método que identificó la mayor cantidad de genes que no fueron identificados por los dos métodos restantes (39 genes).

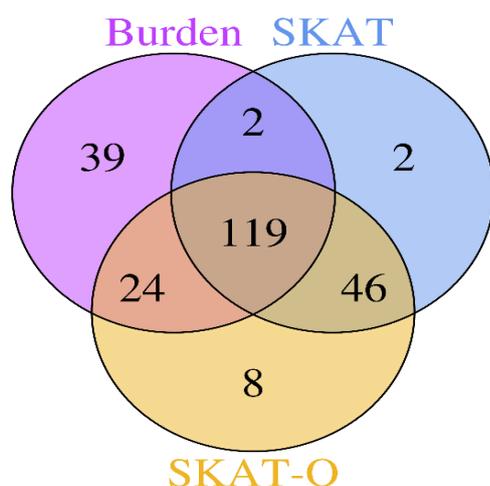


Figura 4. Diagrama de Venn para los tres métodos.
Elaboración propia.

Doce genes de los 119 priorizados en el análisis de asociación de variantes raras se asociaron previamente con otras neoplasias según *Disgenet*, listados en la Tabla 3.

Gen	Enfermedad
<i>PMVK</i>	Neoplasias malignas de piel
<i>HOXD9</i>	Neoplasias colorrectales, adenocarcinoma mucinoso, neoplasia de ovario
<i>ANXA3</i>	Neoplasias prostáticas, neoplasias de ovario, neoplasias de estómago
<i>HOXA2</i>	Neoplasias mamarias
<i>PAK1</i>	Carcinoma de células renales
<i>MFGE8</i>	Neoplasias mamarias, neoplasias hepáticas
<i>IL32</i>	Neoplasias de colon, síndrome de Sézary, neoplasias de riñón, neoplasias de estómago
<i>BCL7C</i>	Ependimoma
<i>PLAUR</i>	Neoplasias metastásicas, neoplasias prostáticas
<i>ERCC1</i>	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas, neoplasias de estómago, metástasis, melanoma, neoplasias testiculares, neoplasias cervicales uterinas, neoplasias de células germinales y embrionarias

Tabla 3. Genes encontrados en neoplasia vesical.
Elaboración propia

Curiosamente, dos de ellos *LIG1* y *ERCC1* se asociaron previamente con neoplasias de vejiga. Además, genes como *ANXA3* o *PLAUR*, se asociaron previamente con cáncer de próstata, y otros como *PAK1* o *IL32* se relacionaron con carcinomas renales y de células de riñón, respectivamente.

• Rutas metabólicas

Se realizó una búsqueda en KEGG para conocer las rutas metabólicas en las que estaban implicados los genes encontrados y se vio que las más interesantes eran:

- "Reparación de escisión de nucleótidos", que tiene otros genes de susceptibilidad a cáncer de vejiga como *XPC* y *XPB*, encontrado previamente en un análisis de asociación (Figura 5).
- "Regulación del citoesqueleto de actina", que tiene otros genes de susceptibilidad a cáncer de vejiga como *FGFR3*, que se encuentran previamente en GWAS.

- "Estrecha unión" que tiene 3 posibles genes de susceptibilidad encontrado en nuestro análisis. En particular, el gen *Claudin6* se encuentra expresado en varias células tumorales, y la metilación de este gen puede estar implicada en génesis tumoral esofágica.

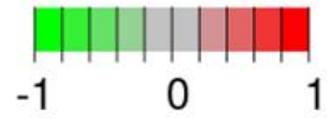
DISCUSIÓN

- Sólo doce genes se asociaron previamente con cualquier neoplasia y, por lo tanto, la mayoría de los genes significativos son nuevos genes de susceptibilidad para cáncer de vejiga. Sin embargo, dos genes identificados en este enfoque (*LIG1* y *ERCC1* en la vía de "escisión de nucleótidos") se informaron previamente como asociados con cáncer de vejiga, lo que respalda estos resultados.
- Otra vía interesante ("Regulación del citoesqueleto de actina") tiene tres nuevos genes de susceptibilidad cáncer de vejiga identificados en este estudio además del ya conocido gen de susceptibilidad para cáncer de vejiga *FGFR3*. Estos resultados agregan evidencia a la participación de estas dos vías a través de variantes comunes y raras en el desarrollo de cáncer de vejiga.
- Otra vía novedosa e interesante que se identifica aquí es "Unión cerrada", con tres genes significativos. Entre ellos, el gen *Claudin6* es el más relevante, ya que su metilación se ha asociado con génesis

CONCLUSIONES

- 1) Hay una buena concordancia entre los tres métodos estadísticos utilizados según su *p-value*.
- 2) La gran cantidad de genes seleccionados por los tres métodos (119) sugiere que las variantes de codificación heredadas en muchos genes contribuyen a la susceptibilidad genética del cáncer de vejiga.
- 3) Las variantes raras asociadas con la susceptibilidad al cáncer de vejiga se encuentran tanto en las vías ya identificadas a través de GWAS como en nuevas vías.
- 4) Es necesario contrastar estos resultados validándolos en una población independiente y más grande, a través de una estrategia de secuenciación dirigida ya que no hay estudios publicados que investiguen el papel de las variantes raras en la susceptibilidad genética para cáncer de vejiga.

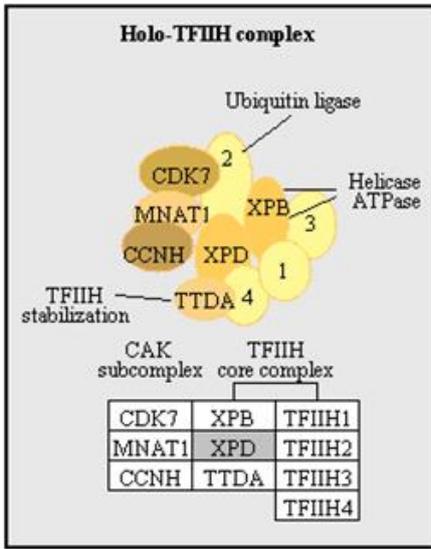
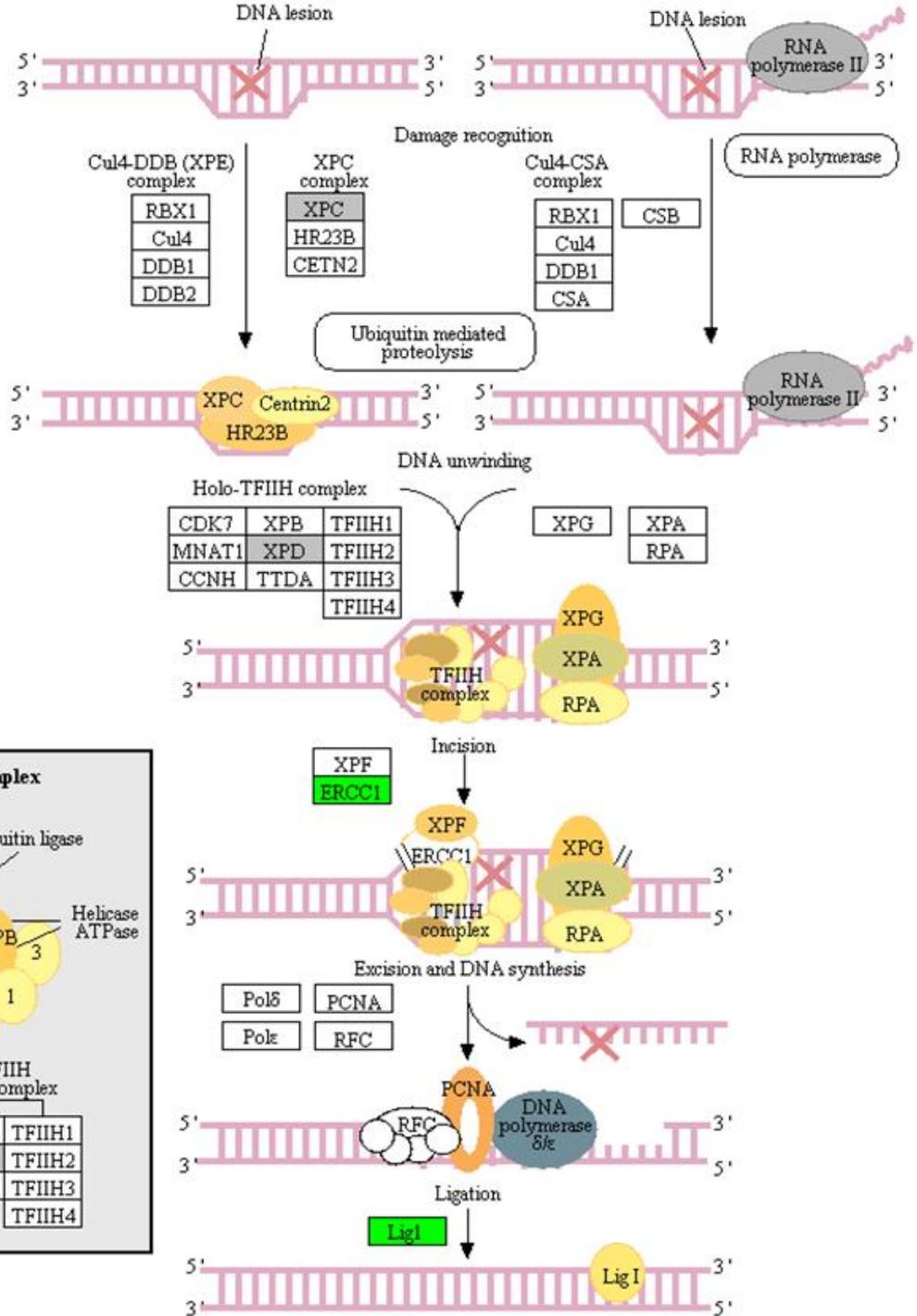
NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR



Eukaryotic type

Globlal genome repair (GGR)

Transcription coupled repair (TCR)



Data on KEGG graph
Rendered by Pathview

Figura 5. Vía metabólica de escisión de nucleótido. Elaboración propia

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Aoki-Kinoshita KF, Kanehisa M. Gene annotation and pathway mapping in KEGG. *Methods Mol Biol.* 2007;396:71-91. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-515-2_6
- Benjamini Y, Hochberg J. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B.* 1995;57(1):289-300
- Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. 2013. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol.* 2013;(63):234-41. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.07.033>
- Chen H, Lumley T, Brody J, Heard-Costa NL, Fox CS, Cupples LA, et al. Sequence Kernel Association Test for Survival Traits. *Genet Epidemiol.* 2014;38(3):191-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/gepi.21791>
- Chen H. 2011. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. (<https://cran.r-project.org/package=VennDiagram>)
- Cohen SM, Shiari T, Steineck G. Epidemiology and etiology of premalignant and malignant urothelial changes. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2000;(205):105-15
- Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. 1998. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasm of the urinary bladder. *Bladder Consensus Conference Committee. Am J Surg Pathol.* 1998 Dec;22(12):1435-48.
- Eichler EE, Flint J, Gibson G, Kong A, Leal SM, Moore JH, et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet.* 2010;11(6):446-50. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrg2809>
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013;49(6):1374-403. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
- Figueroa JD, Middlebrooks CD, Banday AR, Ye Y, García-Closas M, Chatterjee N, et al. Identification of a novel susceptibility locus at 13q34 and refinement of the 20p12.2 region as a multi-signal locus associated with bladder cancer risk in individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet.* 2016 Mar 15;25(6):1203-14. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv492>.
- García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, et al. NAT2 slow acetylation and GSTM1 null genotypes increase bladder cancer risk: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet.* 2005;366(9486):649-59.
- Ghosh D. Incorporating the empirical null hypothesis into the Benjamini-Hochberg procedure. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2012;11(4):/j/sagmb.2012.11.issue-4/1544-6115.1735/1544-6115.1735.xml.
- Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nat Rev Genet.* 2012;13(2):135-45.
- International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide in 2012 [página web]. Lyon: IARC; 2021 [consultada 20 agosto 2020]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>.
- Guillaume L, Guy L. Épidémiologie et facteurs de risque des cancers de la vessie et des tumeurs urothéliales. *Rev Prat.* 2014 Dec;64(10):1372-4, 1378-80.
- Jankovic S, Radosavljevic V. Risk factors for bladder cancer. *Tumori.* 2007;93(1):4-12.
- Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett.* 2013 Nov 1;340(2):284-95. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.025>.
- Leal J, Luengo-Fernández R, Sullivan R, Witjes AJ. Economic Burden of Bladder Cancer Across the European Union. *Eur Urol.* 2016;69(3):438-47.
- Li B, Leal SM. Methods for detecting associations with rare variants for common diseases: application to analysis of sequence data. *Am J Hum Genet.* 2008;83(3):311-21.
- López de Maturana E, Chanok SJ, Picornell AC, Rothman N, Herranz J, Calle ML, et al. Whole Genome Prediction of Bladder Cancer Risk With the Bayesian LASSO. *Genet Epidemiol.* 2014;38(5):467-76.
- Low SK, Takahashi A, Mushiroda T, Kubo M. Genome-Wide Association Study: A Useful Tool to Identify Common Genetic Variants Associated with Drug Toxicity and Efficacy in Cancer Pharmacogenomics. *Clin Cancer Res.* 2018;20(10); 2541-52.
- Luo W, Brouwer C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics.* 2013;29(14):1830-1.
- Madsen BE, Browning SR. A Groupwise Association Test for Rare Mutations Using a Weighted Sum Statistic. *PLoS Genet.* 2009;5(2):e1000384.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461(7265):747-53.
- Morgenthaler S, Thilly WG. A strategy to discover genes that carry multi-allelic or mono-allelic risk for common diseases: A cohort allelic sums test (CAST). *Mutat Res.* 2007;615(1-2):28-56.
- Moyer VA, U.S. Preventive Services Task Force. Screening for bladder cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2011;155(4):246-51.

- Ognenovski M, Renauer R, Gensterblum E, Kotter I, Xenitidis T, Henes JC, et al. Whole Exome Sequencing Identifies Rare-Coding Variants in Behcet's Disease. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(5):1272-80.
- Ouzanne A, Rouprêt M, Leon P, Yates DR, Colin P. Épidémiologie et facteurs de risque des tumeurs de la voie excrétrice urinaire supérieure: revue de la littérature pour le rapport annuel de l'Association française d'urologie. *Prog Urol.* 2014;24(15):966-76.
- Pan W, Kim J, Zhang Y, Shen X, Wei P. A Powerful and Adaptive Association Test for Rare Variants. *Genetics.* 2014;197(4):1081-95.
- Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. Mechanisms of disease: the epidemiology of bladder cancer; *Nat Clin Pract Urol.* 2006;3(6):327-40.
- Piñero J, Bravo A, Queralt-Rosinach N, Gutiérrez-Sacristán A, Deu-Pons J, Centeno E, et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants. *Nucleic Acid Res.* 2017;45(D1):D833-D839.
- Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet.* 2014;59(1):5-15.
- Radosavljevic V, Belojevic G. Shortcomings in bladder cancer etiology research and a model for its prevention. *Tumori,* 2014;100(1):1-8.
- Rothman N, García-Closas M, Chatterjee N, Malats N, Wu X, Figueroa JD, et al. A multi-stage genome-wide association study of bladder cancer identifies multiple susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010;42(11):978-84.
- Samanic C, Kogevinas M, Dosemeci M, Malats N, Real FX, Garcia-Closas M, et al. Smoking and bladder cancer in Spain: effects of tobacco type, timing, environmental tobacco smoke, and gender. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;5(7):1348-54.
- Seunggeung L, Abecasis GR, Boehnke M, Lin X. Rare-Variant Association Analysis: Study Designs and Statistical Test. *Am J Hum Genet.* 2014;95(1):5-23.

REVISIÓN DE LAS GUÍAS CLÍNICAS DE DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE SÍNDROMES DE POLIPOSIS ADENOMATOSAS

Autores: Enrique Albuérne Suárez, Diego Tuñón Le Poutel, Daniel Rueda Fernández

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Cáncer Colorrectal, Poliposis Adenomatosa, Mutation Cluster Region

INTRODUCCIÓN

El Cáncer Colorrectal (CCR) es uno de los tipos de cáncer más frecuentes y que más muertes provoca mundialmente: su incidencia es el 10.2% del total para ambos sexos y su mortalidad el 9,2% del total para ambos sexos¹. Según el modelo clásico de carcinogénesis colorrectal los adenocarcinomas colorrectales malignos son precedidos por pólipos adenomatosos colónicos^{2,3}. De este modo, la extirpación profiláctica de pólipos –polipectomía– se ha demostrado como una manera eficiente de prevenir las muertes por cáncer colorrectal⁴.

Aunque la mayoría de los casos de CCR son esporádicos, se estima que en torno al 5% del total es debido los llamados Síndromes de Cáncer Hereditario^{5,6}, donde los pacientes son portadores de variantes en la línea germinal en ciertos genes de susceptibilidad al cáncer, presentando un mayor riesgo en la aparición de tumores⁵. Entre estos destacan los síndromes de poliposis adenomatosa (PA), que se caracterizan por una alta predisposición al desarrollo de múltiples pólipos adenomatosos a lo largo de todo el colon y el recto, y por lo tanto a una mayor susceptibilidad a la aparición de CCR, debidas principalmente a variantes en los genes *APC* y *MUTYH*⁷. Otros síndromes de predisposición al CCR menos frecuentes, son aquellos caracterizados por la presencia de pólipos hamartomatosos entre otras manifestaciones, causados por variantes en los genes *SMAD4*, *BMPR1A*, *STK11* o *PTEN*. Además, en los últimos años se han identificado varios nuevos genes implicados en PA y/o CCR como son por ejemplo *POLE*, *POLD1*, *NTHL1* o *MSH3*^{6,7}.

TIPO DE POLIPOSIS ADENOMATOSAS

El número de pólipos adenomatosos detectados mediante colonoscopia en el intestino grueso se ha usado clásicamente para estratificar las poliposis adenomatosas. De este modo se habla de poliposis adenomatosa familiar (PAF) (OMIM #175100) en su forma clásica, con más de 100 pólipos adenomatosos, y de poliposis adenomatosa familiar atenuada (PAFA), por debajo de 100 adenomas. Estos dos fenotipos, aunque suponen un continuo gradual, tienen asociados ciertas diferencias en relación con el inicio de la poliposis (en la segunda-tercera década de la vida en PAF vs. posterior en PAFA), localización principal en el colon (lado izquierdo más frecuente en PAF vs. lado derecho más frecuente en PAFA), y riesgo de CCR durante la vida (100% en PAF vs. hasta 70% en PAFA)⁸.

La mayoría de las PAFs clásicas se explican por variantes deletéreas heterocigotas en la línea germinal en el gen *APC* (OMIM *611731), especialmente en la región MCR (*mutation*

cluster region)⁹. El patrón de herencia de la PAF es autosómico dominante, si bien se sabe que existe un porcentaje que puede llegar hasta el 25% de casos *de novo*, sin antecedentes familiares de poliposis¹⁰. Además, pueden observarse manifestaciones extracolónicas, como pólipos del tracto gastrointestinal superior, tumores desmoides, osteomas, tumores tiroideos, cerebrales o hepatoblastoma entre otros⁸. La asociación de PAF con estas tumoraciones extracolónicas constituye el síndrome de Gardner, descrito en 1952¹¹.

La PAFA también está provocada por variantes deletéreas en el gen *APC*, aunque estas suelen estar localizadas fuera de la región MCR. Tal y como se comentaba más arriba el fenotipo polipósico es menor y tampoco son comunes las manifestaciones extracolónicas. Del mismo modo presenta herencia autosómica dominante.

Dentro de las PAFA destaca la poliposis asociada a *MUTYH* (PAM) (OMIM #608456), de herencia autosómica recesiva, causada por variantes bialélicas en el gen reparador *MUTYH* (OMIM *604933). En este gen existen dos variantes patogénicas con una frecuencia significativa en la población general: *MUTYH* c.536A>G (p.Tyr179Cys) (dbSNP: rs34612342; ExAC MAF: 0.001623) y *MUTYH* c.1187G>A (p.Gly396Asp) (dbSNP: rs36053993; ExAC MAF: 0.002798). Además, en nuestro contexto geográfico, destacarían variantes adscritas a poblaciones europeas (c.1147delC, p.Ala385Profs*23), mediterráneas (c.1437_1439del, p.Glu480del) o ibéricas (c.1227_1228dup, p.Glu410Glyfs*43).

Otros subtipos de poliposis adenomatosa serían: la Poliposis asociada a la actividad correctora de errores de las polimerasas (PPAP, *Polymerase proof-reading associated polyposis*), autosómica dominante, debida a variantes en los genes *POLE* (OMIM *174762) y *POLD1* (OMIM *174761)¹²; la Poliposis adenomatosa asociada al gen *MSH3* (OMIM *600887), autosómica recesiva (OMIM #617100)¹³; la Poliposis adenomatosa asociada al gen *NTHL1* (OMIM *602656), autosómica recesiva (OMIM #616415)¹⁴.

La identificación de variantes en línea germinal en un paciente afecto de poliposis adenomatosa, especialmente para en los genes *APC* y *MUTYH*, permite, no solo la confirmación diagnóstica y la adopción de medidas preventivas y profilácticas ajustadas, sino también la identificación de familiares presintomáticos.

Existen diferentes guías clínicas sobre el diagnóstico y manejo de las poliposis adenomatosas, que han ido siendo actualizadas de acuerdo a las mejoras en las técnicas

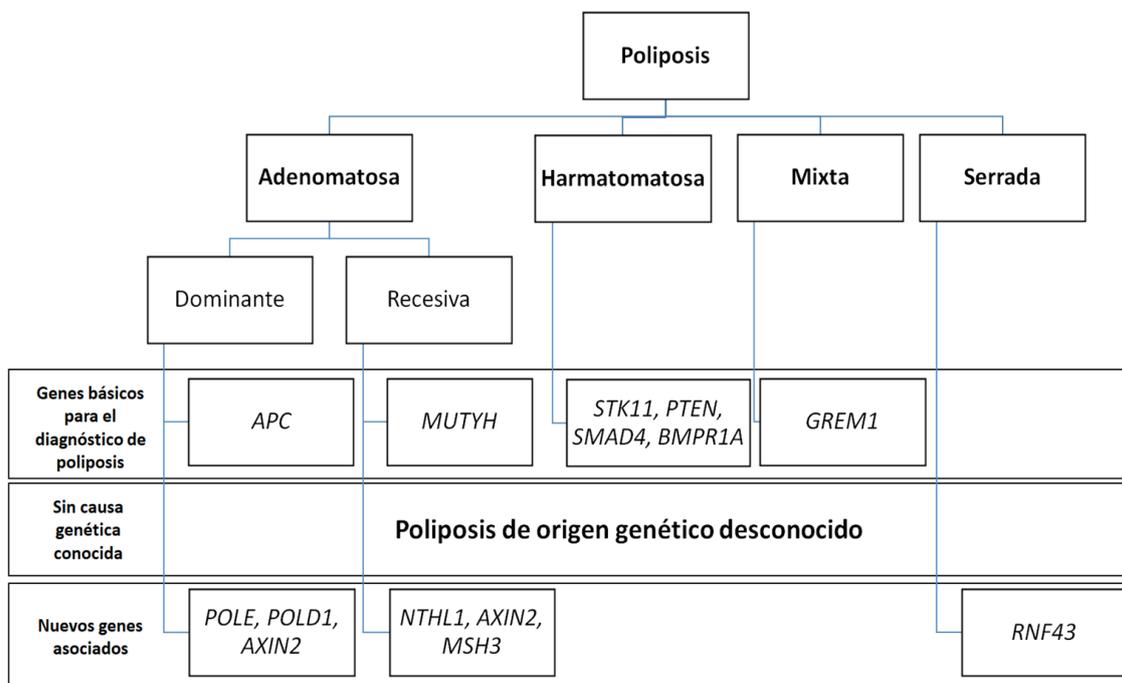


Figura 1. Clasificación de síndromes de poliposis. Adaptado de Lorans M, 2018

endoscópicas, los nuevos genes relacionados con el fenotipo y las nuevas técnicas de secuenciación.

CRITERIOS CLÍNICOS Y ALGORITMOS DIAGNÓSTICOS DE POLIPOSIS ADENOMATOSAS

Según la guía clínica de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) para cáncer colorrectal hereditario¹⁵, en pacientes con más de 100 pólipos adenomatosos debe realizarse el estudio completo del gen *APC*. Si no se encuentra ninguna variante patogénica, se debe analizar el gen *MUTYH*. Por otro lado, si en la familia se observa un patrón de herencia autosómico dominante, el gen *APC* debe analizarse antes, mientras que si se observa un patrón autosómico recesivo debe analizarse en primer lugar el gen *MUTYH*. Los genes *POLE* y *POLD1* pueden analizarse si no se encuentran variantes en los genes *APC* y *MUTYH*. Por otro lado, la guía clínica de 2020 de la *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*¹⁶, una alianza de 27 importantes centros oncológicos de Estados Unidos, nos especifica más ampliamente que criterios clínicos debe cumplir, al menos uno, un paciente para realizar un estudio de poliposis:

- Historia personal de 20 o más pólipos adenomatosos.
- Hipertrofia congénita bilateral del epitelio pigmentario de la retina.
- Considerar estudio si tiene historia personal de entre 10-20 pólipos, hepatoblastoma, tumor desmoide, hipertrofia congénita unilateral del epitelio pigmentario de la retina, variante cribiforme-morular de cáncer papilar de tiroides o criterios de poliposis serrada con algún pólipo adenomatoso.

El algoritmo diagnóstico que propone la NCCN depende de si existe una variante patogénica familiar o no. En caso de

existir, se realiza el análisis genético de esa variante. Si por alguna razón no se puede realizar, el paciente se debe manejar como si hubiera resultado positivo. Si la variante no existe, se recomienda realizar el análisis genético con un panel multigen (*APC*, *MUTYH*, *POLD1*, *POLE*, *GREM1*, *AXIN2*, *BMPR1A*, *SMAD4*, *NTHL1*, *MSH3*, *PTEN*, *STK11*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* y *EPCAM*).

MANEJO DEL PACIENTE DIAGNOSTICADO DE FAP

En cuanto al manejo, para pacientes diagnosticados de FAP la SEOM recomienda la cirugía como medida preventiva debido a que el riesgo de desarrollar cáncer a los 50 años es del 100%. Las opciones son una colectomía abdominal total con anastomosis ileorrectal (TAC/IRA) o una proctocolectomía con anastomosis anal con reservorio (TPC/IPAA). La NCCN añade la opción de proctocolectomía total e ileostomía terminal (TPC/EI) cuando no sea posible la IPAA.

Para la vigilancia de pacientes diagnosticados de FAP que todavía no han sido sometidos a cirugía la SEOM recomienda, si el análisis genético resulta no informativo, una sigmoidoscopia flexible cada 2 años desde los 10-15 hasta los 40 años de edad, una cada 3-5 años hasta los 50 y a partir de esa edad con menos frecuencia. Si en alguna de estas sigmoidoscopias se detectan nuevos pólipos, se debe realizar una colonoscopia. Si el análisis genético es informativo, se debe realizar una sigmoidoscopia flexible cada dos años desde los 10-15 años y una vez que se detecten nuevos pólipos adenomatosos se debe realizar una colonoscopia anual hasta que el paciente vaya a cirugía. La guía clínica de la *European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE)*¹⁷ recomienda comenzar la vigilancia desde los 12-14 años con una periodicidad de 1-2 años dependiendo de la gravedad de la poliposis.

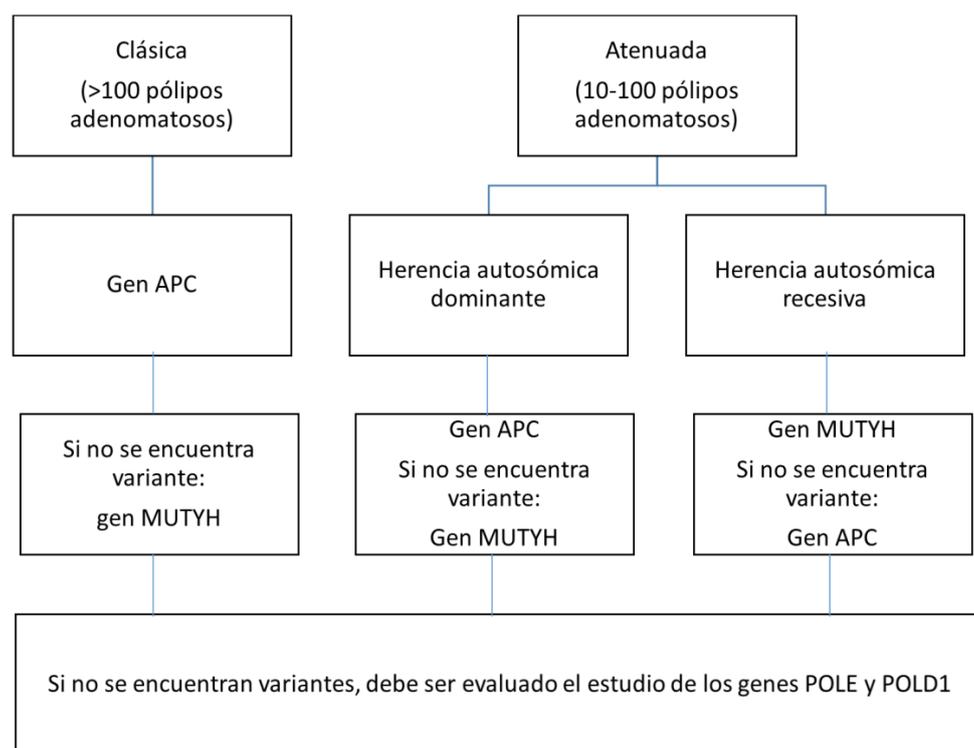


Figura 2. Algoritmo diagnóstico de poliposis adenomatosa según los criterios de la SEOM.
Adaptado de: Guillén-Ponce C, 2015

Tras la cirugía en pacientes sometidos a TAC/IRA la SEOM y la NCCN recomiendan realizar una proctoscopia cada 6-12 meses y en pacientes sometidos a TPC/IPAA la SEOM recomienda realizar una ileoscopia cada 1-3 años, mientras que la NCCN recomienda que sea anual o incluso cada 6 meses dependiendo de las características de los pólipos encontrados en revisiones anteriores. La ESGE recomienda una vigilancia cada 1-2 años dependiendo de la gravedad y recomienda la polipectomía endoscópica de todo pólipo mayor de 5mm de diámetro y todo pólipo rectal.

Las recomendaciones respecto a la vigilancia colónica y extracolónica de pacientes diagnosticados de FAP, se resumen en la Tabla 1.

MANEJO DEL PACIENTE DIAGNOSTICADO DE PAFA

Respecto a la PAFA, la SEOM indica que el diagnóstico antes de los 20 años es extremadamente inusual y recomienda una colonoscopia cada dos años desde los 18-20 años. La NCCN recomienda una colonoscopia cada 1-2 años con polipectomía de los pólipos que sean manejables por endoscopia. Al contrario que en la FAP, la cirugía no suele ser necesaria en pacientes diagnosticados de PAFA. Sin embargo, la NCCN aclara que, si los pólipos no son manejables endoscópicamente, se recomienda una TAC/IRA en la mayoría de los casos y una TPC/IPAA si hay una poliposis rectal importante.

MANEJO DEL PACIENTE DIAGNOSTICADO DE PAM

Respecto a pacientes diagnosticados de PAM, la SEOM nos indica que los pólipos sospechosos detectados en las

colonoscopias deben ser extirpados hasta que, debido a su tamaño y densidad, no puedan ser manejados solo con polipectomía (la ESGE especifica que debe ser extirpado todo pólipo mayor de 5 mm de diámetro). Entonces se procederá a la cirugía que consistiría en una colectomía parcial o proctocolectomía.

Para la vigilancia, la SEOM recomienda pancolonoscopia desde los 18-20 años y endoscopia alta a partir de los 25-30 años, sin especificar su periodicidad, la ESGE recomienda iniciar la vigilancia desde los 18 años con una periodicidad de 1-2 años y la NCCN también recomienda una periodicidad de la vigilancia de 1-2 años a partir de los 25-30 años y tras cirugía una proctoscopia cada 6-12 meses y una endoscopia alta desde los 30-35 años.

Por último, la SEOM y la ESGE no proporcionan especificaciones para la vigilancia de portadores heterocigotos de una variante patogénica en el gen *MUTYH*. La NCCN especifica que, para probandos portadores heterocigotos no aquejados de cáncer colorrectal pero con un pariente en primer grado diagnosticado de cáncer colorrectal, se recomienda una colonoscopia cada 5 años a partir de los 40 años de edad o 10 años antes de la edad de diagnóstico de cáncer colorrectal de su pariente.

MANEJO DEL PACIENTE DIAGNOSTICADO DE PPAP

La NCCN recomienda, para pacientes con variantes patogénicas en *POLE* y *POLD1*, colonoscopia desde los 20-25 años de edad con una periodicidad de 2-3 años si resultan negativas y cada 1-2 años si se encuentran pólipos, considerando la cirugía cuando no puedan ser manejados solo con polipectomía.

Vigilancia	Riesgo	Recomendaciones de la SEOM	Recomendaciones de la NCCN
Colon	El riesgo de desarrollar cáncer a los 50 años es del 100%	Sigmoidoscopia flexible cada 2 años desde los 10-15 hasta los 40 años de edad, una cada 3-5 años hasta los 50 y a partir de esa edad con menos frecuencia.	Colonoscopia (preferentemente) o sigmoidoscopia flexible cada año desde los 10-15 años de edad.
Tracto gastro-intestinal superior	Se detectan pólipos en el duodeno en un 50-90% de los pacientes. El riesgo de desarrollar cáncer de duodeno se mide en función de la clasificación de Spigelman (5 estadios dependiendo del número, tamaño, histología y estadio de displasia de los pólipos) siendo de un 5% para los estadios 0-II y elevándose a un 36% para los estadios III-IV.	Las recomendaciones varían según el estadio de Spigelman (desde duodenoscopia cada 5 años para los 0-I hasta cirugía para estadio IV).	Duodenoscopia desde los 20-25 años. Considerar empezar antes si presenta historia familiar de cáncer de duodeno.
Tumores desmoides	Aproximadamente un 10-15% de los pacientes portadores de variantes patogénicas desarrollarán un tumor desmoide, usualmente intraabdominal.	La tomografía computarizada y la resonancia magnética son útiles cuando se sospecha de la presencia de un tumor desmoide. El tratamiento consiste en antiinflamatorios no esteroideos vs sulindaco con tamoxifeno. Tras progresión, se puede emplear quimioterapia. La cirugía solo se reserva para complicaciones abdominales.	Realizar tomografía computarizada o resonancia magnética cuando se sospecha de la presencia de un tumor desmoide. Si existen antecedentes personales de tumores desmoides, realizar revisiones con una frecuencia mínima anual.
Tiroides	Los pacientes con PAF tienen un riesgo de desarrollar cáncer de tiroides del 2-6% con una prevalencia en mujeres del 95%. El pico de incidencia se sitúa en la tercera década.	Examen físico y ecografía de tiroides anual desde los 15 años.	Ecografía desde la adolescencia tardía cada 2-5 años si es normal. Si es anormal, derivar a especialista. Considerar aumentar la frecuencia si el paciente presenta historia familiar de cáncer de tiroides.
Hepatoblastoma	El riesgo de hepatoblastoma en pacientes con PAF es 750-7500 veces mayor que el de la población general, sin embargo, el riesgo absoluto se sitúa en tan solo un 2%. La mayoría suelen aparecer antes de los 3 años de edad.	Ecografías abdominales y niveles de alfafetoproteína cada 2-3 meses hasta los 5 años de vida. Quimioprevención. Los antiinflamatorios no esteroideos reducen la incidencia y recurrencia de los hepatoblastomas.	Examen físico, ecografía abdominal y determinación de niveles de alfafetoproteína cada 3-6 meses hasta los 5 años de vida.
Cáncer gástrico	La mayoría de los pacientes con FAP presentan pólipos en las glándulas fúndicas. También pueden presentar una displasia focal de bajo grado que no suele progresar.	No se pronuncia.	En pacientes con lesiones de alto riesgo que no pueden ser extirpadas endoscópicamente debe considerarse una gastrectomía.
Tumores del sistema nervioso central	No existe un alto grado de evidencia.	No se pronuncia.	Examen físico anual.
Cáncer de páncreas	No existe un alto grado de evidencia.	No se pronuncia.	Screening individualizado según historia familiar de cáncer de páncreas.

Tabla1. Recomendaciones de la SEOM y de la NCCN respecto a la vigilancia de pacientes con FAP. Adaptado de: Guillén-Ponce C, 2015 y Gupta S, 2020

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424.
2. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990;61(5):759-67.
3. Gehart H, Clevers H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018;16(1):19-34.
4. Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Hankey BF, et al. Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *N Engl J Med*, 2012;366(8):687-96.
5. Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med*, 2008. 359(20): p. 2143-53.
6. Peters U, Bien S, Zubair N. Genetic architecture of colorectal cancer. *Gut*. 2015 Oct;64(10):1623-36.
7. Valle L. Recent Discoveries in the Genetics of Familial Colorectal Cancer and Polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jun;15(6):809-19.
8. Grover S, Kastrinos F, Steyerberg EW, Cook EF, Dewanwala A, Burbidge LA, et al. Prevalence and phenotypes of APC and MUTYH mutations in patients with multiple colorectal adenomas. *JAMA*. 2012 Aug 1;308(5):485-92.
9. Leoz ML, Carballal S, Moreira L, Ocaña T, Balaguer F. The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. *Appl Clin Genet*. 2015 Apr 16;8:95-107.
10. Gardner EJ, Richards RC. Multiple cutaneous and subcutaneous lesions occurring simultaneously with hereditary polyposis and osteomatosis. *Am J Hum Genet*. 1952;5:139-47.
11. Aretz S, Stienen D, Friedrichs N, Stemmler S, Uhlhaas S, Rahner N, et al. Somatic APC mosaicism: a frequent cause of familial adenomatous polyposis (FAP). *Hum Mutat*. 2007 Oct;28(10):985-92.
12. Palles C, Cazier JB, Howarth KM, Domingo E, Jones AM, Broderick P, et al. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet*. 2013 Feb;45(2):136-44.
13. Adam R, Spier I, Zhao B, Kloth M, Marquez J, Hinrichsen I, et al. Exome Sequencing Identifies Biallelic MSH3 Germline Mutations as a Recessive Subtype of Colorectal Adenomatous Polyposis. *Am J Hum Genet*. 2016 Aug 4;99(2):337-51.
14. Weren RD, Ligtenberg MJ, Kets CM, de Voer RM, Verwiel ET, Spruijt L, et al. A germline homozygous mutation in the base-excision repair gene NTHL1 causes adenomatous polyposis and colorectal cancer. *Nat Genet*. 2015 Jun;47(6):668-71.
15. Guillén-Ponce C, Serrano R, Sánchez-Heras AB, Teulé A, Chirivella I, Martín T, et al. Clinical guideline seom: hereditary colorectal cancer. *Clin Transl Oncol*. 2015 Dec;17(12):962-71.
16. Gupta S, Giardiello FM, Maguire L, Weiss JM, Grady W, Markowitz AJ, et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal. Version 1. 2020. *J Natl Compr Canc Netw*. 2020 Apr;18(4):380-391
17. Van Leerdam ME, Roos VH, van Hooft JE, Dekker E, Jover R, Kaminski MF, et al. Endoscopic management of polyposis syndromes: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy*. 2019 Sep;51(9):877-895.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Lorans M, Dow E, Macrae FA, Winship IM, Buchanan DD. Update on Hereditary Colorectal Cancer: Improving the Clinical Utility of Multigene Panel Testing. *Clin Colorectal Cancer*. 2018 Jun;17(2):e293-e305.

SECUENCIACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL COMPLETO. A PROPÓSITO DE DOS CASOS

Autores: Adrián González-Quintana, Alberto Blázquez Encinar, Miguel Ángel Martín Casanueva

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Miopatía Mitocondrial, ARN transferente, Secuenciación masiva

CASOS CLÍNICOS

Caso 1

Niño de 13 años que consulta por cansancio, intolerancia al ejercicio físico desde los 9 años y dolor en ambos gemelos a los 5 minutos de empezar a caminar, correr y/o subir escaleras. Esta sintomatología asocia sensación disneica, palidez cutánea, sudoración profusa y vómitos. No ha presentado hipoglucemias ni síncope. Sin antecedentes familiares conocidos.

Los valores de CK sérica fueron normales a excepción de una determinación aislada de 978 UI/L. Se realizó una prueba funcional de ejercicio muscular en condiciones de isquemia obteniendo muestras de venopunción antes y después de realizar el ejercicio (a los 0 min, 1 min, 2 min, 5 min y 10 min) para determinar los valores de glucosa, lactato, amonio y CK, encontrándose valores elevados de lactato que oscilaron entre 3,72 y 5,51 mmol/L (valor de referencia <2,0 mmol/L) y valores de amonio dentro del intervalo normal de referencia. La valoración cardiológica no mostró ninguna alteración.

Los hallazgos de la biopsia muscular de cuádriceps fueron compatibles con miopatía mitocondrial. Los estudios histoquímicos detectaron signos de proliferación mitocondrial, tales como fibras rojo rasgadas (RRF) y leves refuerzos subsarcolémicos, además de la presencia de fibras citocromo c oxidasa (COX) negativas. La actividad de la miofosforilasa fue normal.

Las actividades enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) en homogenado de tejido muscular revelaron un déficit combinado de los complejos I, III y IV. Además se observó un aumento de la actividad de matriz mitocondrial, citrato sintasa, lo que indica signos de proliferación mitocondrial.

Caso 2

Mujer de 27 años que presenta intolerancia al ejercicio desde los primeros minutos de esfuerzo. Antecedentes personales de deficiencia de carnitina por metabolopatía congénita en tratamiento. Sin antecedentes familiares conocidos.

Los resultados de la biopsia de músculo deltoides derecho fueron compatibles con una miopatía mitocondrial, con presencia de numerosas fibras COX negativas y RRF, y predominio de fibras tipo I (oxidativas). La actividad miofosforilasa fue normal.

El análisis enzimático mediante espectrofotometría UV-vis de los complejos de la CRM en homogenado de tejido muscular mostró un déficit combinado de los complejos I, III y IV; y una elevación de la actividad de citrato sintasa.

INTRODUCCIÓN

- La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo intracelular encargado de producir la energía en forma de ATP necesaria para la actividad celular, proceso que se lleva a cabo a través del ciclo de Krebs, CRM y la fosforilación oxidativa (OXPHOS, del inglés *oxidative phosphorylation*). Participa, además, en otras muchas rutas metabólicas, procesos de apoptosis y señalización celular. Posee dos membranas, una externa lisa y otra interna plegada, formando las crestas mitocondriales, donde se encuentran ubicados los complejos multiprotéicos I al IV y el complejo V (ATP sintasa), donde se lleva a cabo la síntesis de ATP, ver Figura 1.

Las mitocondrias contienen su propio material genético, el ADN mitocondrial (ADNmt). El ADNmt humano es una molécula circular de doble cadena constituida por 16569

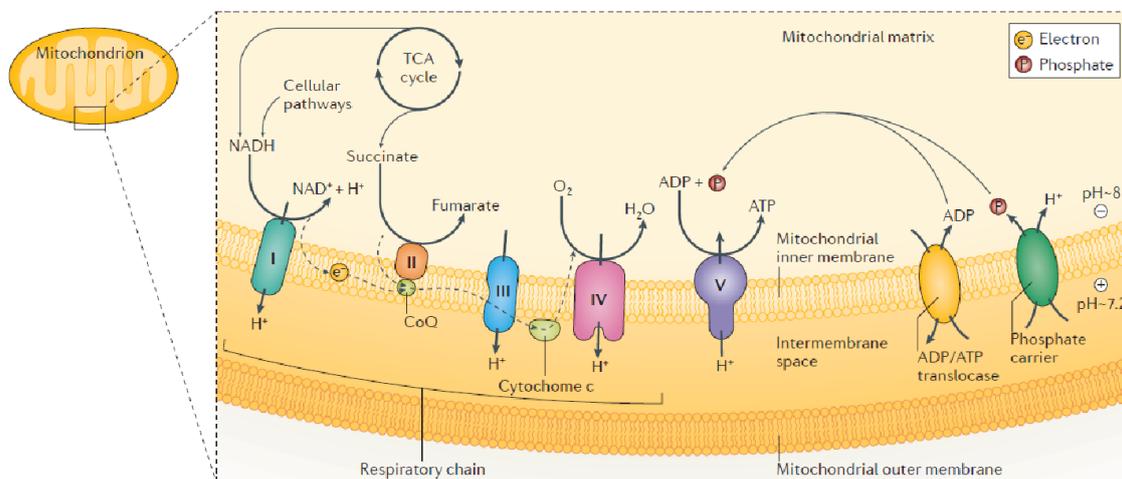


Figura 1. Esquema del sistema OXPHOS. Tomado de: Gorman *et al*, 2016

pares de bases que contiene 37 genes que codifican para 2 ARN ribosómicos (ARNr) y 22 ARN de transferencia (ARNt) que son necesarios para la traducción mitocondrial, y para 13 subunidades estructurales de los complejos del sistema OXPHOS (siete subunidades pertenecen al complejo I: ND1-ND6 y ND4L; una al complejo III: citocromo b; tres al complejo IV: COI-III; y dos al complejo V: ATP6 y ATP8)¹. El resto de los componentes estructurales que forman parte de una mitocondria funcional, incluidas la mayoría de las subunidades de los diferentes complejos de la cadena respiratoria (alrededor de 90) y sus factores de ensamblaje, así como los componentes de la maquinaria de replicación y expresión del propio genoma mitocondrial, están codificados en el genoma nuclear (ADNn), son traducidos en los ribosomas citoplásmicos e importados a la mitocondria. La estructura del ADNmt es extraordinariamente compacta, de tal manera que los genes no poseen intrones ni regiones 5' o 3' no traducidas (UTRs, del inglés *untranslated regions*). Además, no hay apenas espacios intergénicos, produciéndose incluso un solapamiento entre zonas codificantes para algunos genes (p.ej. *MT-ATP6* y *MT-ATP8*).

- Genoma mitocondrial

La genética mitocondrial presenta una serie de características que la distinguen de la genética nuclear:

- El código genético mitocondrial difiere levemente del código genético universal.
- El genoma mitocondrial es poliploide, así cada tipo celular, dependiendo de sus requerimientos energéticos, contiene un número de mitocondrias, y cada una de ellas, en general, de 5 a 10 copias de ADNmt, pudiéndose dar dos situaciones: aquella en la que todas las moléculas son idénticas (homoplasmia) o aquella en la que coexisten dos o más genotipos diferentes (heteroplasmia).
- La división de las mitocondrias y la replicación del ADNmt son procesos independientes del ciclo celular. Además, cuando la célula se divide, las mitocondrias se distribuyen entre las células hijas al azar. Todo ello da lugar al fenómeno de segregación mitótica. Según este mecanismo, en un paciente con una mutación heteroplásmica, la proporción de moléculas de ADNmt mutadas puede variar de un tejido a otro, y en un mismo tejido cambiar a lo largo del tiempo. Esto puede provocar que los síntomas observados puedan variar con el paso del tiempo y que la edad de comienzo, para una misma alteración, sea diferente de unos pacientes a otros.
- La tasa de mutación espontánea del ADNmt es de unas 10 veces superior a la del ADNn.
- La expresión fenotípica de una mutación patogénica del ADNmt no sigue las reglas de la herencia mendeliana, y depende, en gran medida, de las proporciones del ADNmt normal y mutado que existen en un tejido en particular. El efecto umbral representa la proporción mínima de ADNmt mutado necesaria para que se produzca la disfunción en un determinado órgano o tejido. Este porcentaje varía de unos tejidos a otros, y depende del requerimiento energético del mismo, en un momento dado y en una situación de estrés. Tejidos como el cerebro, corazón, músculo esquelético, y en

particular la musculatura ocular, tienen grandes demandas de energía procedentes de la vía oxidativa y por tanto umbrales menores que otros, como la piel o la sangre.

- Por último, cabe destacar que esta molécula se hereda exclusivamente por vía materna.
 - Enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales, también conocidas como enfermedades OXPHOS, son un conjunto heterogéneo de alteraciones y trastornos cuyo nexo es una disfunción primaria de la cadena respiratoria mitocondrial o de la ATP sintasa, con la consiguiente disminución de producción de energía en forma de ATP. Las enfermedades mitocondriales son patologías raras que en conjunto tienen una prevalencia de 1:5.000², aunque la frecuencia de portadores de mutaciones en el genoma mitocondrial (ADNmt) es alrededor de 1 en 200³.

Los trastornos mitocondriales pueden afectar un solo órgano (como la Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber, LHON), pero la mayoría involucran múltiples sistemas de órganos, particularmente aquellos que son altamente dependientes del metabolismo aeróbico (cerebro, músculo esquelético, corazón, riñón y sistema endocrino) y a menudo son progresivos con alta morbilidad y mortalidad. Los rasgos clínicos más típicos de las enfermedades mitocondriales incluyen: ptosis, oftalmoplejía externa, miopatía proximal e intolerancia al ejercicio, miocardiopatía, sordera neurosensorial, retinopatía pigmentaria, encefalopatía, convulsiones, migraña y diabetes mellitus⁴.

El inicio de los síntomas ocurre a cualquier edad, aunque habitualmente los fenotipos más graves se presentan en los primeros momentos de la vida o infancia, y los fenotipos menos graves ocurren en la edad adulta. Por tanto, la presentación clínica es muy variable en relación con la edad de inicio, los síntomas, la gravedad y el pronóstico. Dado que en la formación de la cadena respiratoria participan los dos sistemas genéticos de la célula, las enfermedades mitocondriales pueden estar ocasionadas por mutaciones en genes nucleares o por mutaciones en el ADNmt. En este capítulo nos centraremos en los trastornos del ADNmt. Las primeras mutaciones en el ADN mitocondrial se identificaron en 1988, y hasta la fecha se han descrito más de 400 lesiones moleculares en el ADNmt⁵.

Generalmente, las enfermedades mitocondriales del ADNmt pueden clasificarse en relación a la alteración genética subyacente en 4 categorías (Tabla 1):

- Mutaciones puntuales en genes codificantes de subunidades estructurales del sistema OXPHOS.
- Mutaciones puntuales en genes implicados en la síntesis de proteínas (ARNt y ARNr).
- Reordenamientos del ADNmt, incluyendo deleciones únicas o múltiples y duplicaciones de este.
- Depleción o disminución del número de copias del ADNmt.

Gen/Mutaciones	Enfermedad	OMIM
Genes codificantes de subunidades del sistema OXPHOS		
<i>MT-ND4</i> : m.11778G>A	Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)	535000
<i>MT-ND1</i> : m.3460G>A		
<i>MT-ND6</i> : m.14484T>C		
<i>MT-ND5</i> : m.13513G>A	Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y accidentes cerebro-vasculares (MELAS)	540000
	Síndrome de Leigh	256000
<i>MT-ATP6</i> : m.8993T>G, m.8993T>C	Neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP)	551500
	Síndrome de Leigh	256000
Genes implicados en la síntesis de proteínas: ARNt y ARNr		
<i>MT-TL1</i> : m.3243A>G	Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y accidentes cerebro-vasculares (MELAS)	540000
	Diabetes y sordera mitocondrial (MIDD)	520000
	Síndrome de Leigh	256000
	Cardiomiopatía	-
	Miopatía	-
<i>MT-TK</i> : m.8344A>G	Epilepsia mioclónica con fibras rojo rasgadas (MERFF)	545000
<i>MT-RNR1</i> : m.1555A>G	Sordera neurosensorial no sindrómica (NSSND)	500008
Reordenamientos del ADNmt		
Grandes deleciones únicas y duplicaciones	Síndrome de Pearson	557000
	Síndrome de Kearns-Sayre (KSS)	530000
	Oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO)	-
Deleciones múltiples por mutaciones en genes nucleares del mantenimiento del ADNmt	Oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO)	-
Depleción del ADNmt		
Mutaciones en genes del mantenimiento del ADNmt	Síndrome de depleción del ADN mitocondrial (MDS)	-

Tabla 1. Alteraciones genéticas más comunes en el ADNmt asociadas con enfermedades OXPHOS. Adaptada de Blázquez *et al*, 2016

Las mutaciones puntuales suelen ser heredadas mientras que las deleciones únicas y duplicaciones suelen producirse de forma esporádica durante la oogenesis o en el desarrollo embrionario. Por otro lado, la depleción del ADNmt y las deleciones múltiples son realmente un fenotipo molecular

causado por la presencia de mutaciones en genes nucleares que participan en el mantenimiento del ADNmt. Los déficits combinados de los complejos de la CRM se han asociado tanto a mutaciones en genes nucleares implicados en la replicación y/o mantenimiento del ADNmt, modificación

de los ARNt, genes codificantes para factores de elongación, proteínas ribosomales, aminoacil-ARNt sintetasas y otros; como a mutaciones en genes del ADNmt, principalmente ARNt mitocondriales, y a grandes deleciones del ADNmt.

Entre las más de 30 mutaciones identificadas en ARNt mitocondriales registradas en Mitomap (www.mitomap.org), la mutación m.3243A>G en el gen mitocondrial ARNt-Leu^(UUR) (*MT-TL1*) y la mutación m.8344A>G en el gen mitocondrial ARNt-Lys (*MT-TK*) son los más comunes. La mutación m.3243A>G está presente en aproximadamente el 80% de los pacientes con encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y accidentes cerebro-vasculares (MELAS), en aproximadamente el 2-7% de los pacientes con diabetes y sordera de herencia materna (MIDD), y puede aparecer en otros fenotipos, ver Tabla 1. La mutación m.8344A>G está presente en más del 80% de los enfermos con epilepsia mioclónica con fibras rojo rasgadas (MERRF). Además, las mutaciones identificadas en los 22 ARNt dan lugar a diversos fenotipos que van desde cardiomiopatías graves hasta moderadas intolerancias al ejercicio. Estos hechos resaltan la dificultad para establecer la patogenia y el diagnóstico de los trastornos mitocondriales⁶

RESULTADOS DEL CASO CLÍNICO

La presencia de un cuadro clínico de debilidad muscular e intolerancia al ejercicio en estos dos pacientes, junto con los datos bioquímicos (déficit combinados de complejos de la CRM) e histopatológicos (presencia de fibras COX negativas y RRF) sugieren un diagnóstico de miopatía mitocondrial.

Ante la sospecha de una mutación en un ARNt mitocondrial, se realizó un análisis de las 19 mutaciones más frecuentes del ADNmt (incluidas la *MT-TL1*: m.3243A>G y *MT-TK*: m.8344A>G) mediante la técnica de minisequenciación que resultaron negativas. En paralelo, se realizó la secuenciación Sanger del gen *MT-TL1* completo que también fue negativo.

La traslación de las tecnologías genómicas, específicamente la secuenciación masiva-NGS, desde la investigación clínica a la práctica asistencial en el Servicio de Bioquímica ha facilitado el estudio del ADNmt completo y los genes mitocondriales nucleares en los enfermos con sospecha de enfermedad mitocondrial OXPHOS permitiendo incrementar la tasa de diagnóstico genético y resolver cuál es la causa genético-molecular implicada en estos pacientes.

En este contexto, ambos casos presentados se incluyeron para la secuenciación del ADNmt completo a alta profundidad. El ADNmt se amplificó en un único fragmento (≈ 16.6 Kb) por PCR larga (del inglés, *Long-Range PCR*) para posteriormente proceder a la generación de librerías. La secuenciación se realizó en el secuenciador Ion-PGM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), siguiendo el protocolo recomendado. El análisis bioinformático, que incluye el

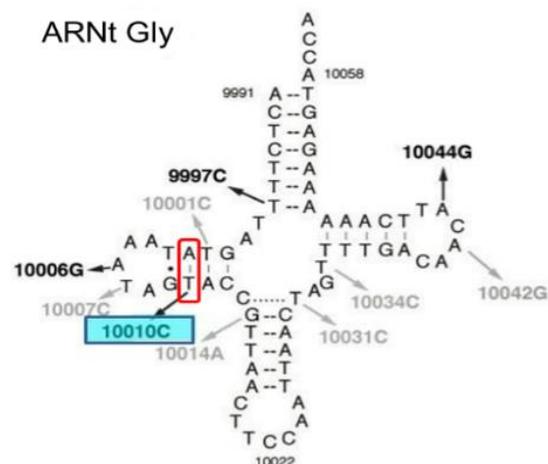


Figura 3. Estructura secundaria del ARNt Gly mitocondrial. Marcada en azul la mutación identificada. Marcada en rojo unión Watson-Crick entre el par 12A:23U. Adaptada de la web <http://mamit-trna.u-strasbg.fr>

alineamiento de las secuencias frente al genoma mitocondrial de referencia (NC_012920.1, *revised Cambridge Reference Sequence*) y la detección de las variantes se llevó a cabo en el *Torrent Suite* mediante el alineador *TMAP-variant caller* plugin. La anotación de variantes se realizó mediante la integración de bases de datos procedentes de Mitomap y predictores MitImpact mediante el uso de “scripts” propios.

Los resultados de la secuenciación masiva del ADNmt completo se pueden ver en la Tabla 2.

La mutación m.10010T>C se visualizó en el software IGV (*Integrative Genomics Viewer*) y fue además confirmada por secuenciación convencional Sanger, confirmándose en ambos casos que la mutación estaba presente y se encontraba en aparente homoplasmia en ADN obtenido de tejido muscular en el caso 1 y prácticamente en homoplasmia en el caso 2, ver Figura 2.

La variante m.10010T>C en el gen *MT-TG*, que codifica para el ARNt-Gly del ADNmt (encargado de transportar el aminoácido glicina para su incorporación en el proceso de traducción mitocondrial), se ha descrito como patogénica en la literatura en asociación con dos tipos fenotípicos clínicos. Un fenotipo consistente en encefalomiopatía, convulsiones, ataxia progresiva y tetraparesia espástica⁷, y un fenotipo más leve asociado a miopatía, intolerancia al ejercicio e hiperCKemia^{8,9}. Este último cuadro clínico es similar a aquel observado en los casos descritos en este capítulo. Además, esta variante no aparece en ninguna secuencia de ADNmt

Caso	Gen	Variante	Heteroplasmia	Profundidad	Haplogrupo
1	<i>ARNt-Gly</i>	m.10010T>C	100%	1100	J1c3
2	<i>(MT-TG)</i>		95%	3109	H3c2a

Tabla 2. Variantes identificadas mediante secuenciación masiva del ADNmt completo. Elaboración propia

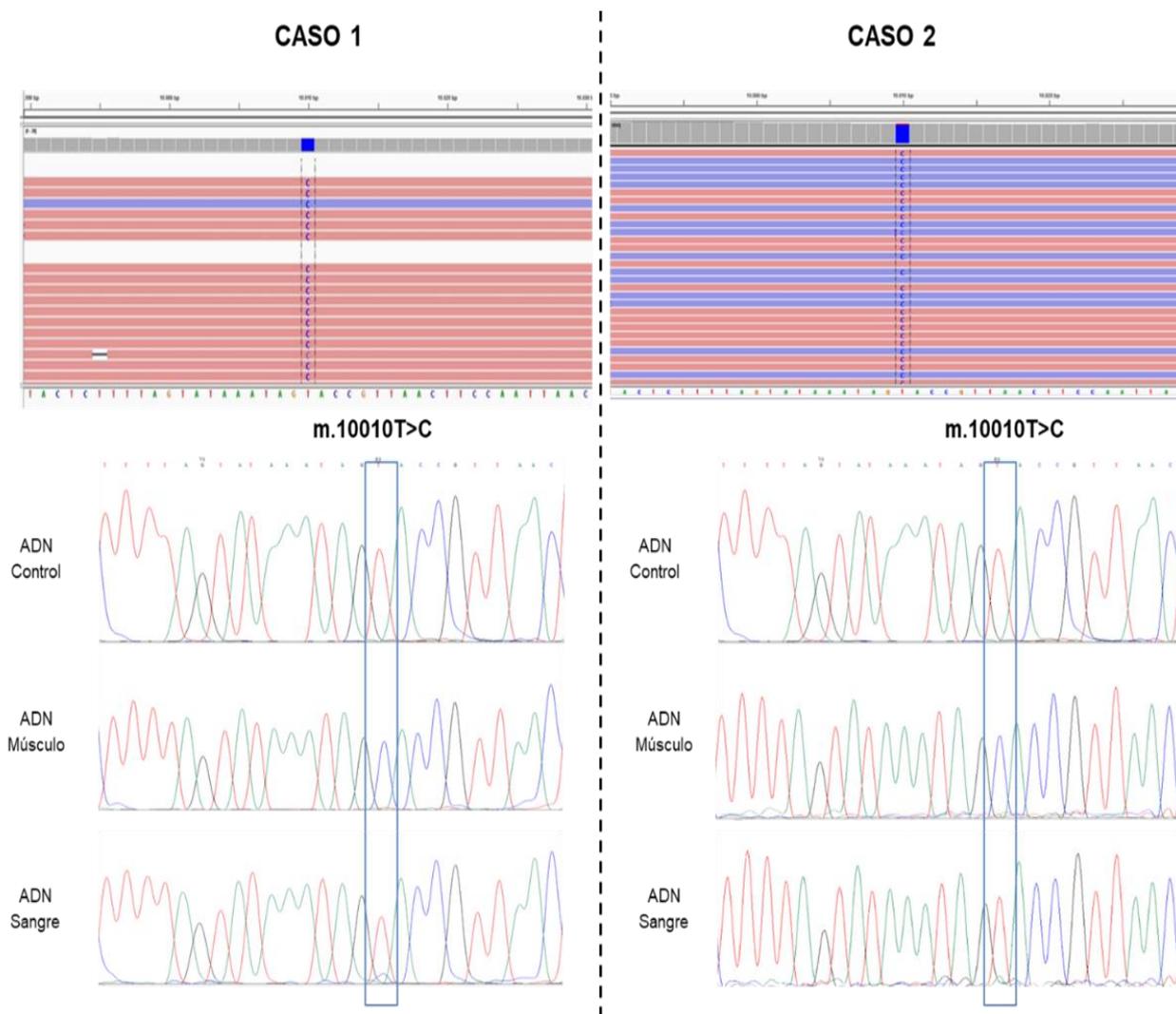


Figura 2. Visualización de mutación 10010T>C en el programa IGV y electroferogramas de la secuenciación Sanger en músculo y sangre de ambos casos. Elaboración propia

depositada en Genbank ni en la base de datos de variantes polimórficas del ADNmt.

La sustitución nucleotídica m.10010T>C afecta al par 12A:23U de la región “DHU stem” dentro de la estructura del ARNt-Gly, lo que predice la ruptura de una unión Watson-Crick, que a su vez podría alterar la estructura tridimensional del ARNt y su función, ver Figura 3.

Posteriormente se procedió al estudio de la mutación en células sanguíneas de ambos pacientes. En el caso 1, la mutación m.10010T>C mostró una heteroplasmia mutante ≈15% mediante secuenciación Sanger, ver Figura 2. Este hallazgo refleja que los niveles de heteroplasmia (la proporción de ADNmt mutante) son a menudo más altos en los tejidos postmitóticos y son más bajos en aquellos tejidos que se dividen rápidamente como es en el caso de las células sanguíneas, con un recambio mitótico frecuente. Presumiblemente, las células que contienen altos niveles de heteroplasmia de una mutación en el ADNmt presentan una desventaja selectiva y están energéticamente comprometidas ⁷. En el caso 2, no logró detectar la presencia

de la mutación m.10010T>C en sangre mediante secuenciación Sanger, ver Figura 2.

La segregación familiar de esta mutación sólo se pudo realizar en la madre del caso 2, que mostró una ausencia de la mutación m.10010T>C mediante secuenciación Sanger. Este hecho sugiere, que en el caso 2 la mutación podría ser esporádica (*de novo*) y circunscrita al tejido muscular. Sin embargo, el estudio de la mutación en sangre y/u células uroepiteliales de otros familiares de la rama materna, y del propio paciente sería fundamental para confirmar si la mutación es esporádica (*de novo*).

RESUMEN

Las características clínicas que presentaron estos dos pacientes ponen de manifiesto la heterogeneidad clínica de las enfermedades mitocondriales del sistema OXPHOS, particularmente aquellas debidas a mutaciones en el ADNmt. La incorporación de la secuenciación del genoma mitocondrial completo a alta profundidad mediante NGS en el laboratorio clínico representa una poderosa herramienta de diagnóstico para identificar la base etiológica genético-molecular en pacientes previamente no diagnosticados.

Mediante este enfoque, a menudo se identifican mutaciones nuevas o ya publicadas que pueden asociarse con características clínicas diferentes de las del paciente descrito inicialmente. Esto confirma una vez más la gran variabilidad genética observada en las enfermedades mitocondriales. En los dos casos presentados, esta aproximación genómica ha permitido identificar la mutación m.10010T>C del ARNt-Gly, que previamente había sido descrita como patogénica, permitiendo llegar al diagnóstico genético-molecular de enfermedad mitocondrial en ambos pacientes. Estos casos aquí descritos, evidencian la importancia de poseer material genético de familiares para poder caracterizar la segregación familiar y demostrar el modo de herencia o la presentación de *novo* de la mutación identificada, y por tanto, realizar un consejo genético post-test adecuado.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457-465.
2. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2:16080.
3. Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF. Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population. *Am J Hum Genet*. 2008;83(2):254-260.
4. Chinnery Patrick F. Mitochondrial Disorders Overview. In: *GeneReviews*. ; 2014.
5. Bai R, Higgs JD. Mitochondrial Disorders. In: Leonard DGB, ed. *Molecular Pathology in Clinical Practice*. New York: Springer International Publishing; 2016. p.139-159.
6. Blázquez A, Arenas J, Martín MA. Molecular Genetics of OXPHOS Disorders. In: *ELS*. John Wiley & Sons; 2016. p. 1-10.
7. Bidooki SK, Johnson MA, Chrzanowska-Lightowlers Z, Bindoff LA, Lightowlers RN. Intracellular Mitochondrial Triplasmcy in a Patient with Two Heteroplasmic Base Changes. *Am J Hum Genet*. 1997;60(6):1430-1438.
8. Nishigaki Y, Bonilla E, Shanske S, Gaskin DA, DiMauro S, Hirano M. Exercise-induced muscle "burning," fatigue, and hyper-CKemia: mtDNA T10010C mutation in tRNA Gly. *Neurology*. 2002;58(8):1282-1285.
9. Crimi M, Galbiati S, Sciacco M, et al. Mitochondrial-DNA nucleotides G4298A and T10010C as pathogenic mutations: the confirmation in two new cases. *Mitochondrion*. 2004;3(5):279-283.

ESTRATEGIAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Autores: María Victoria Huertas García¹, Pablo Serrano-Lorenzo², Miguel Ángel Martín Casanueva^{1,2}

¹Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital 12 de Octubre, Madrid

²Grupo i+12 Enfermedades Raras, Mitocondriales y Neuromusculares, Servicio Bioquímica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Tratamiento, Mitocondriales, Ensayos

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades mitocondriales son un grupo heterogéneo de enfermedades metabólicas complejas causadas por un déficit en la síntesis de ATP derivado de un incorrecto funcionamiento de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) en la mitocondria. Cuando este sistema es defectuoso, las células no tienen suficiente energía, y como consecuencia el oxígeno molecular y los sustratos metabólicos no utilizados se acumulan en las células causando daños.

Una de sus características es que presentan una genética compleja, ya que pueden estar desencadenadas tanto por mutaciones en el ADN mitocondrial (mtDNA) como en el ADN nuclear (nDNA) y muestran, por tanto, distintos patrones de herencia: autosómica dominante y recesiva, ligada al cromosoma X y mitocondrial.

El número de moléculas de mtDNA por célula es, en general, muy elevado y varía de unos tejidos a otros. Cuando las células de un individuo tienen moléculas idénticas de mtDNA se denomina homoplasmia. Sin embargo, una parte de estas enfermedades se caracterizan por la presencia de mutaciones en el mtDNA, por lo que pueden coexistir dos poblaciones de moléculas de mtDNA, una normal y otra mutada (heteroplasmia).

La relación genotipo-fenotipo suele ser variable, lo que implica que pacientes con la misma mutación pueden exhibir distintas manifestaciones clínicas o que un mismo síndrome sea causado por mutaciones en diferentes genes, como el síndrome de Leigh que se ha asociado a mutaciones en aproximadamente 80 genes distintos, tanto nucleares como mitocondriales. Otro ejemplo es el fenotipo heterogéneo que se observa en pacientes con la mutación m.3243A>G, causante de manifestaciones que van desde el síndrome MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis lácticas y episodios similares a ictus) o el síndrome de Leigh, hasta diabetes y sordera, cardiomiopatía o miopatía. Esta expresión clínica va a depender del requerimiento energético del órgano afectado, el grado de heteroplasmia, y la edad de aparición de los síntomas, entre otros factores.

Las mitocondrias se encuentran todas las células del organismo, y por tanto, estas enfermedades pueden ser multisistémicas con manifestaciones clínicas muy variadas. Frecuentemente, se presentan como anomalías neurológicas o miopatías que afectan al músculo esquelético o cardíaco, aunque otros tejidos pueden verse afectados. Otras manifestaciones características son sordera, oftalmoplejía, ptosis o diabetes.

La deficiencia mitocondrial observada en estas enfermedades también ha sido asociada a otras patologías, como el la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), y al envejecimiento en sí, por lo que ha aumentado el interés en posibilidades de intervenciones para su corrección.

Todo esto, unido a un conocimiento incompleto de los mecanismos involucrados en las diferentes patologías, hace que este grupo de enfermedades supongan un desafío a nivel de diagnóstico y tratamiento:

- Diagnóstico: la doble naturaleza de las mutaciones (nuclear y mitocondrial) y el gran número de proteínas mitocondriales existentes (aproximadamente 1500 proteínas forman el proteoma mitocondrial) las hace difíciles de diagnosticar. La introducción de nuevas tecnologías como la *next generation sequencing* (NGS) ha permitido la identificación de nuevos genes, habiéndose identificado en la actualidad más de 350 genes causantes de patología mitocondrial, lo que ha ayudando a comprender mejor los mecanismos responsables de las diferentes patologías y abriendo la puerta al uso de distintas estrategias para el desarrollo de terapias más específicas no consideradas previamente.
- Tratamiento: las estrategias de tratamiento actuales son principalmente sintomáticas, dedicándose a intentar compensar el defecto bioquímico presente y a corregir las descompensaciones metabólicas agudas que se puedan presentar y los síntomas derivados de estas, mejorando así la calidad y la esperanza de vida de los pacientes.

Algunos ejemplos son el uso de anticonvulsivantes para la epilepsia, hipoglucemiantes para la diabetes o la realización de ejercicio físico regular para aumentar el contenido mitocondrial celular.

En este capítulo hablaremos de las distintas estrategias propuestas para el desarrollo de tratamientos específicos y de algunos de los ensayos que se están llevando a cabo en estos campos, lo que supone una esperanza para el futuro de la población que padece enfermedades mitocondriales. Al final de este, daremos unas pequeñas pinceladas sobre los métodos de prevención de la transmisión a la descendencia.

Respecto a los tratamientos específicos, hablaremos de dos grandes grupos: las terapias basadas en el desarrollo de *small-molecules* y las basadas en la manipulación del genoma mitocondrial.

TERAPIAS BASADAS EN SMALL-MOLECULES

Una *small-molecule* es un compuesto orgánico de bajo peso molecular, que por definición no es un polímero, y que se une con gran afinidad a un biopolímero para alterar su actividad o función.

El peso molecular máximo suele ser de 600 Daltons, lo que le va a permitir una rápida difusión a través de la membrana celular y así poder alcanzar los lugares de acción.

Dentro de este grupo encontramos un gran abanico de estrategias:

- Manipulación del contenido mitocondrial de la célula

Los esfuerzos se centran en aumentar el número de mitocondrias presentes en la célula, aumentando su síntesis, y/o disminuyendo su eliminación.

Se ha trabajado principalmente en el aumento de la síntesis, buscando moléculas reguladoras de la misma sobre las que se pueda intervenir. Un ejemplo es el de la familia de receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR) y su coactivador gamma 1 alfa (PGC-1 α). La actividad mediada por estos reguladores estimula la síntesis de diversos transcritos que llevan en última instancia al aumento del número de mitocondrias.

Ensayos con agonistas directos de PPAR como el bezafibrato, un fármaco utilizado para el tratamiento de la hiperlipidemia, se han llevado a cabo sin observarse efectos beneficiosos por el momento.

Se ha visto que una sobreexpresión de PGC-1 α puede incrementar la actividad COX en ratones modificados que presentan deficiencia en el ensamblaje del complejo citocromo c oxidasa. Siguiendo la estela de estos resultados, se han buscado moléculas que puedan aumentar la actividad de PGC-1 α . Dentro de estas moléculas tenemos el fármaco AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida mononucleótido) o el Resveratrol, activadores de la AMP quinasa y de SIRT1 respectivamente y que, en última instancia, aumentan la actividad de PGC-1 α .

Por el momento, estos ensayos aún no aportan mucha evidencia que apoye el uso de estas moléculas, siendo el ejercicio físico regular el mejor método probado para aumentar la masa mitocondrial. Sin embargo, este campo se presenta como prometedor para el desarrollo de futuras terapias.

- Restauración de los niveles de NAD+

Uno de los efectos que se observan cuando la mitocondria no funciona bien, es la disminución de los niveles de NAD+ y, consecuentemente, de los del ratio NAD+/NADH. NAD+ es un sustrato esencial para la función de proteínas claves, como la poliADP-ribosa polimerasa (PARP) o las sirtuinas desacetilasas.

Para compensar este descenso, el piruvato es reducido a lactato y el NADH oxidado a NAD+. El lactato producido es transportado al exterior causando la acidosis láctica característica de las enfermedades mitocondriales.

Se ha intentado restituir estos niveles mediante la suplementación con precursores. Ejemplos como la nicotinamida ribosa (NR) o la nicotinamida mononucleótido (NMN) han demostrado tener efectos beneficiosos en los ensayos llevados a cabo en ratones. La primera provoca un aumento de la síntesis y una restauración de la morfología normal, pero para observar sus efectos se requiere una dosis muy elevada; la NMN disminuye la acidosis láctica y aumenta los niveles de NAD+ y NADH en músculo esquelético, sin observarse efectos a nivel cerebral. Actualmente hay ensayos en curso para ver su eficacia en humanos.

Otro derivado niacínico ya aprobado para el tratamiento de la dislipemia, el Acipimox®, ha demostrado su eficacia mediante el incremento de la respiración mitocondrial en músculo esquelético *ex vivo* y, actualmente, también hay ensayos para ver si realmente alivia el daño muscular.

Una de las estrategias más recientes es aprovechar la vía de síntesis de *novo* del NAD+ gracias a la ruptura de L-triptófano en la vía de las quineurinas. En esta vía se genera el semialdehído del ácido 2-amino-3-carboximucónico (ACMS), que por acción de una descarboxilasa (ACMSD) se transforma en ácido-2-aminomucónico. Se ha visto que si esta enzima está inhibida, el ACMS se convierte en NAD+ espontáneamente.

Otro acercamiento elegante ha sido reoxidar el lactato extracelular a piruvato y transportarlo al interior de la célula para que pueda volver a reducirse y producir NAD+. Recientemente ha sido publicado por *Patgiri et al.* (2020) un ensayo en este campo, en el que inyectan una lactato-oxidasa bacteriana en la circulación de ratones con disfunción mitocondrial inducida obteniéndose buenos resultados.

- ¿Puede el incremento de la mitofagia ser beneficioso?

El eje PINK:PARKIN puede selectivamente promover la eliminación de fragmentos mitocondriales deficientes con la ayuda de la ubiquitina. Manipular este eje promoviendo su actividad podría ser beneficioso en casos que presenten heteroplasmia. En ensayos con dos modelos, uno heteroplásmico de *C. Elegans* y otro en el que se modificaron los músculos implicados en el vuelo de distintos insectos, se ha probado ya la eficacia del aumento de actividad de este eje, disminuyendo los niveles de mtDNA mutado y así disminuyendo la heteroplasmia. Ensayos llevados a cabo con activadores directos de este eje, como la urolitina A, ya han demostrado su efecto mejorando la salud mitocondrial en humanos.

- Reprogramación metabólica

Como ejemplo para entender esta estrategia, se ha utilizado las pantallas *knockout* de CRIPSR-Cas9 y la selección química para intentar descubrir si hay alguna *small-molecule* que pueda resolver el defecto asociado al Complejo I en el Síndrome de Leigh. Se ha visto que la pérdida del bromo-dominio en la proteína BRD4

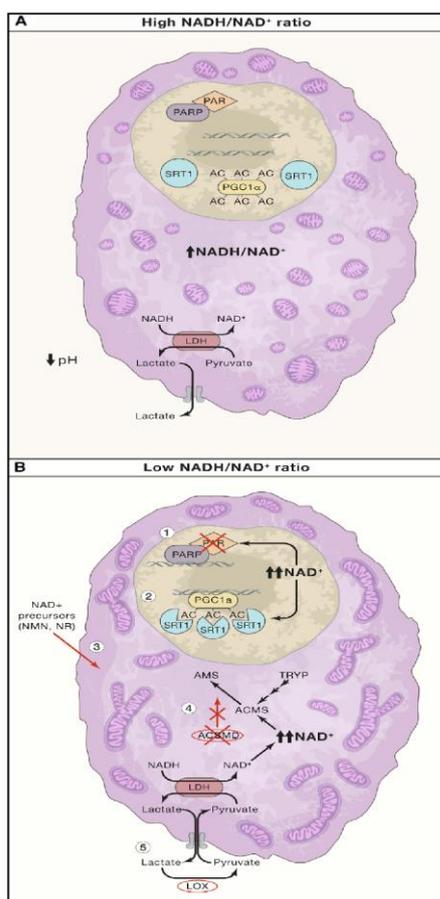


Figura 1: ejemplos de restauración de los niveles de NAD⁺ en la célula. (A) Mecanismo compensatorio fisiológico (B) Distintas estrategias terapéuticas expuestas: Efecto del aumento de NAD⁺ en PPAR y PGC-1 α , Precusores de NAD⁺, Inhibidores de ACSMD, Reoxidación de lactato extracelular. Tomado de: Russell *et al*, 2020

supone el aumento de los niveles PGC-1 α , la prevención del agotamiento celular por galactosa y, aunque no se resolvió el déficit del Complejo I, se llevó a una reprogramación metabólica realizando un "bypass" al Complejo II vía FADH₂ como inicio de la cadena respiratoria.

Esto es solo un ejemplo de cómo estas técnicas pueden ser usadas como posible vía para la identificación de posibles dianas y, como consecuencia, de posibles tratamientos.

- Modulación del efecto de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del estrés oxidativo

La mitocondria es una de las principales fuentes de ROS en el organismo ya que los electrones en el Complejo I y III son descargados al oxígeno del organismo dando lugar a moléculas como el superóxido, que actúan en la formación de intermedios químicamente activos que pueden dañar proteínas, ácidos nucleicos o lípidos. Especies que atacan a ROS, como los antioxidantes, se usan en el tratamiento para proteger a la mitocondria de este daño. Moléculas como KH176, un antioxidante derivado de la vitamina E, se encuentran dentro de ensayos activos en humanos para demostrar su eficacia.

En este grupo tenemos otros fármacos que ejercen el mismo efecto:

- Elamipretide, un tetrapéptido con diana mitocondrial que parece disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno y estabilizar la cardiolipina en pacientes con afectación cardíaca.
- Idebenona, un análogo de la ubiquinona que actúa como transportador de electrones y como antioxidante. Presenta eficacia reduciendo la pérdida de agudeza visual en pacientes que padecen Neuropatía óptica de Leber (LHON) y, de hecho, es el único fármaco de todos los presentados en este capítulo que cuenta con aprobación de las agencias reguladoras del medicamento para tal uso.
- Restauración de la homeostasis del mtDNA

Defectos en el sistema encargado del correcto mantenimiento del mtDNA pueden ser tratados mediante la aportación de los desoxinucleótidos externos como vemos en el siguiente ejemplo:

La enzima timidina-quinasa 2 (TK2) es una proteína clave del mantenimiento del mtDNA y cuando existe un déficit se produce una cantidad insuficiente de los desoxinucleósidos necesarios para su síntesis y una alteración de la composición mitocondrial. En su forma más severa, los niños empiezan a manifestar disfunción muscular durante el primer año de vida. A medida que la enfermedad progresa, se ven afectadas capacidades vitales, llegando a provocar fallo respiratorio.

En un ensayo, bajo programa de uso compasivo, se ha administrado vía oral los nucleósidos timina y desoxicitidina a pacientes con deficiencia de TK2, observándose mejoras claras tanto en las funciones motoras como en la supervivencia.

El tratamiento con desoxinucleósidos para este tipo de enfermedades mitocondriales es una estrategia por considerar, pero cada caso tiene que ser estudiado individualmente.

Pese al aumento de posibles enfoques para el tratamiento de enfermedades mitocondriales, pocas moléculas han demostrado su eficacia para uso en tratamiento específico, siendo la Idebenona la única que cuenta aprobación para tal uso, observándose eso sí un efecto beneficioso más genérico.

Lo que sí se expone es la existencia de múltiples estrategias en las que podemos seguir trabajando e investigando para intentar conseguir algún tratamiento específico en el futuro.

TERAPIAS BASADAS EN LA MANIPULACIÓN DEL GENOMA MITOCONDRIAL

A la hora de manipular el genoma mitocondrial tenemos que aprovechar el hecho de que casi la totalidad de enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el mtDNA se caracterizan por presentar heteroplasmia, es decir, vamos a tener copias de mtDNA mutadas sobre las que podemos actuar selectivamente para intentar

modificarlas o eliminarlas, y otras de tipo *Wild-Type* (WT) no afectas que se pueden replicar.

Para poder llevar a cabo lo anterior tenemos que garantizar que cualquier tratamiento aplicado sea capaz de alcanzar el material genético atravesando la membrana mitocondrial interna. Para mantener el gradiente electroquímico que la caracteriza, esta membrana es bastante impermeable a sustancias, presentando transportadores selectivos que permiten el paso de moléculas sin modificar el potencial de membrana, por lo que las técnicas/tratamientos aplicados deben o cruzar la membrana directamente, o aprovechar los transportadores ya existentes.

Otra consideración a tener en cuenta es que tenemos que actuar específicamente sobre el mtDNA mutado degradándolo, permitiendo que el tipo WT se replique. De todas las técnicas disponibles de modificación del material genético que disponemos, las basadas en nucleasas con dedos de zinc (ZFNs) y en nucleasas de actividad similar a activador de transcripción (TALENs) son las que se pueden aplicar a nivel mitocondrial, ya que CRISPR-Cas9 necesita de una guía de RNA (sgRNA) para su actividad, y esta no está disponible en la mitocondria.

Se presentan como un sistema dual formado por proteínas que reconocen y se adhieren al mtDNA en una zona específica, generalmente una de ellas a la mutación y la otra a una zona adyacente de la misma, fusionadas con una endonucleasa tipo *fokI* en forma de dímero. Para aumentar la sensibilidad de ZNFs y TALENs, se modifica el extremo terminal añadiéndole el residuo COXVIII-MTS, que dirige la molécula específicamente a la mitocondria. Además, las ZNFs requieren de una secuencia de exclusión nuclear para evitar afectar al nDNA.

Como se observa en la Figura 2, cuando se enfrenta a mtDNA tipo WT, solo se une una de las proteínas, impidiendo la formación del dímero de *FokI*. Por el contrario, cuando se enfrenta a mtDNA mutado, ambas proteínas se unen a zonas adyacentes del material genético, permitiendo la formación de *FokI* y su actividad como enzima de restricción, eliminándolo y disminuyendo así la heteroplasmia.

- Expresión alotópica:

Otra estrategia es la de expresar los genes mitocondriales desde el núcleo y que la proteína sintetizada en el citosol se internalice en la mitocondria aprovechando la maquinaria natural de importación de proteínas. Se considera como una de las opciones más viables para el tratamiento genético de las enfermedades causadas por mutaciones en el mtDNA.

Se basa en la introducción del material genético de interés en el núcleo gracias a técnicas como el uso de adenovirus.

El gen que se pretende expresar tiene que rediseñarse de manera que se pueda expresar en el núcleo y que el ARNm sea traducido correctamente por los ribosomas citosólicos. Debe tenerse en cuenta que en los humanos el código genético y el uso de codones mitocondriales son diferentes a los nucleares, por ejemplo, el codón UAG que codifica para triptófano de acuerdo con el

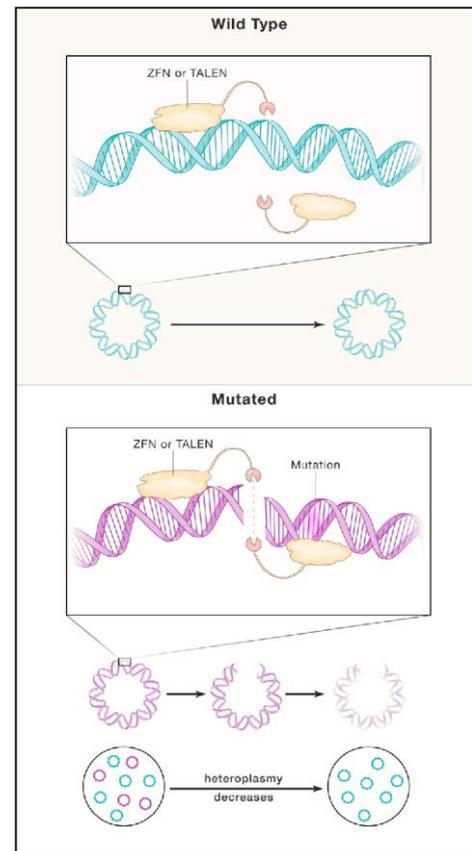


Figura 2: actividad de las técnicas ZFN y TALEN cuando se enfrentan a mtDNA tipo Wild-Type y a mtDNA mutado. Tomado de: Russell *et al*, 2020

código genético mitocondrial es interpretado como un codón de paro en el código genético nuclear.

Después de ser sintetizada, la proteína deberá de desplazarse a la mitocondria, para lo que requiere de la presencia de una secuencia señal o MTS en el extremo N-terminal que pueda ser eliminada por una proteasa mitocondrial una vez que haya atravesado completamente la membrana mitocondrial.

MÉTODOS DE PREVENCIÓN DE LA TRANSMISIÓN

En aquellas familias afectas con mutaciones en el nDNA las opciones son similares a las que padecen cualquier otra enfermedad genética nuclear: consejo genético, test o cribados prenatales en muestras obtenidas por amniocentesis o biopsia de vellosidades coriónicas y el diagnóstico genético preimplantacional (DGP).

En familias afectas con mutaciones en el mtDNA, la prevención es más complicada principalmente por la heteroplasmia. Como observamos en la figura 4, puede que de una madre afecta no se transmita la enfermedad a la descendencia si el oocito presenta un bajo nivel de heteroplasmia que no supere el umbral para que se den las manifestaciones clínicas, o que ocurra justo lo contrario.

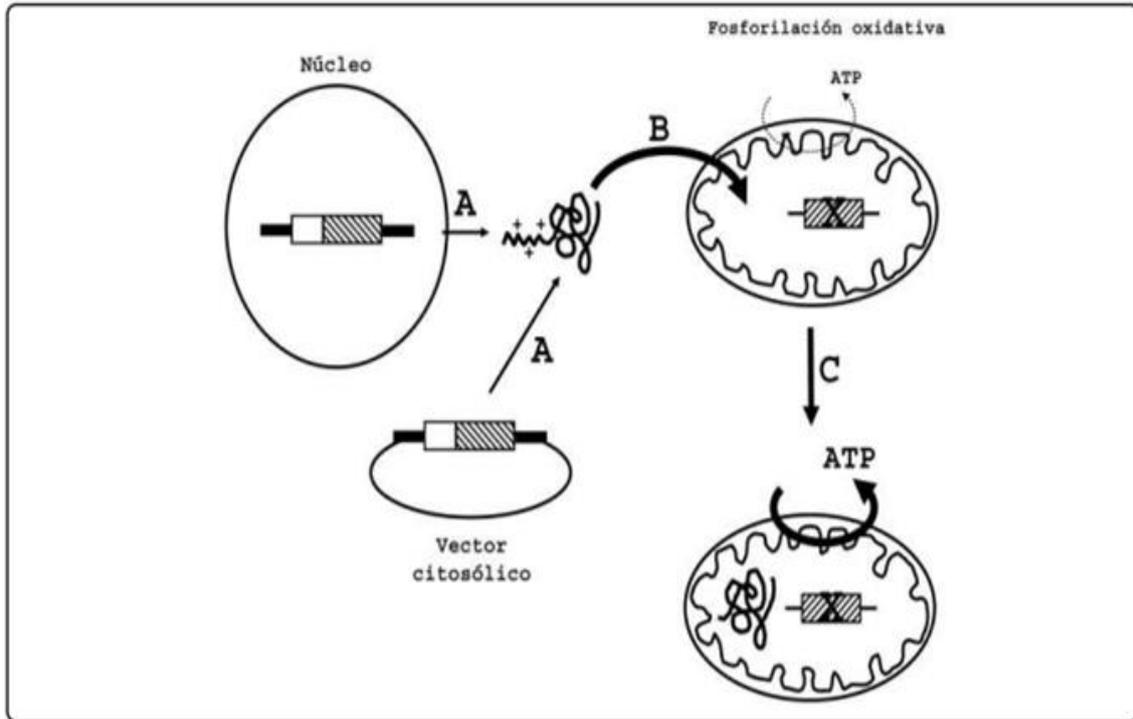


Figura 3: El fundamento de la expresión alotópica. Una mutación en un gen mitocondrial, denotada por una X, trae consigo una deficiencia de la fosforilación oxidativa en la mitocondria. La expresión de la proteína mitocondrial correspondiente en el núcleo o en un vector citosólico (A) seguida de su importación a la mitocondria (B), supone una restauración de la función y un aumento de la fosforilación oxidativa. MTS se ilustra como una α -hélice con cargas positivas. Tomado de: Figueroa-Martínez *et al*, 2011

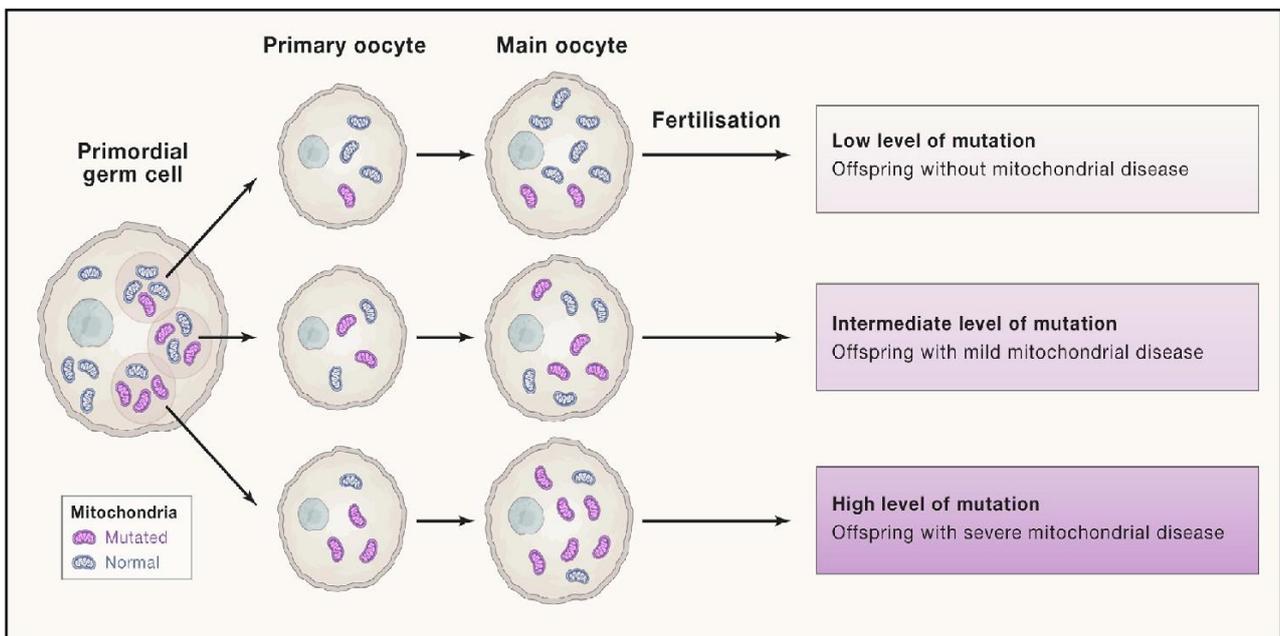


Figura 4: Transmisión de enfermedades mitocondriales en función de la heteroplasma del oocito. Tomado de: Russell *et al*, 2020

Es muy importante un correcto diagnóstico de la etiología génica de la enfermedad para controlar la prevención de la transmisión.

Se puede realizar también consejo genético, pero los test/cribados no son fiables, ya que el nivel de heteroplasma no es homogéneo en todas las células, y la muestra puede no ser representativa.

Se propone el uso del DGP, con análisis de los oocitos para únicamente seleccionar aquellos que presenten menor grado de heteroplasmia, pero esto no asegura al 100% la no transmisión o la posible aparición de síntomas en el futuro.

- Terapia de reemplazo mitocondrial (MRT):

Esta terapia es una opción emergente, y algo polémica, para prevenir la transmisión. Consiste en coger un oocito de una donante sobre el que se pueden llevar a cabo dos estrategias, sustituir el núcleo del oocito por el de la mujer afecta y después fecundarlo, o realizar el mismo proceso de sustitución, pero con el oocito ya fecundado. El resultado es el mismo, un feto con material genético de dos mujeres y un hombre. Hoy en día esta técnica es legal únicamente en el Reino Unido.

Como conclusiones para finalizar el capítulo, queremos recalcar que es esencial tratar de conocer el mecanismo molecular de la enfermedad para individualizar terapias en cada paciente.

Las estrategias actuales de tratamientos son mayoritariamente sistemáticas, intentando mitigar los síntomas asociados a la enfermedad y así mejorar la calidad y la esperanza de vida de los pacientes. Mientras que la búsqueda por mejores tratamientos continúa, es importante garantizar el acceso a un correcto tratamiento sistemático. De los más de 50 ensayos que están actualmente en curso, las evidencias actuales que los apoyan son principalmente anecdóticas, siendo Idebenona el único fármaco con aprobación de la FDA/EMA.

Respecto a la terapia génica, pese a que no ofrece soluciones definitivas, los avances son esperanzadores.

Durante las últimas décadas se han producido importantes progresos en el campo de investigación de las enfermedades mitocondriales, abriendo nuevos caminos tanto para la investigación de tratamientos como en las técnicas de prevención de las mismas.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Andreux PA, Blanco-Bose W, Ryu D, Burdet F, Ibberson M, Aebischer P, et al. The mitophagy activator urotithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans. *Nat. Metab.* 2019;1(6):595–603.
- Bacman SR, Kauppila JHK, Pereira CV, Nissanka N, Miranda M, Pinto M, et al. MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA^{Ala} levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation. *Nat. Med.* 2018;24():1696–1700.
- Bacman SR, Williams SL, Pinto M, Peralta S, Moraes CT. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat. Med.* 2013;19(9):1111–3.
- Domínguez-González C, Madruga-Garrido M, Mavillard F, Garone C, Aguirre-Rodríguez FJ, Donati MA, et al. Deoxynucleoside Therapy for Thymidine Kinase 2-Deficient Myopathy. *Ann Neurol.* 2019;86(2):293–303.
- Figueroa-Martínez FJ, González-Halphen D. La expresión alotópica: ¿tarea imposible o estrategia factible para el tratamiento de enfermedades mitocondriales? *TIP.* 2011;14(2):106-19.
- González Halphen D. Combatiendo las enfermedades mitocondriales: estrategias para el desarrollo de terapias génicas y estrategias de prevención. *Rev Odontol Mex.* 2015;19(3):146-8.
- Katsyuba E, Mottis A, Zietak M, De Franco F, van der Velpen V, Gariani K, et al. De novo NAD⁺ synthesis enhances mitochondrial function and improves health. *Nature.* 2018;563(7731):354–9.
- Patgiri A, Skinner OS, Miyazaki Y, Schleifer G, Marutani E, Shah H, et al. An engineered enzyme that targets circulating lactate to alleviate intracellular NADH:- NAD⁺ imbalance. *Nat Biotechnol.* 2020 Mar;38(3):309-313. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0377-7>.
- Russell OM, Gorman GS, Lightowlers RN, Turnbull DM. Mitochondrial Diseases: Hope for the Future. *Cell.* 2020;181(1):168-88. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.051>.

APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA DE LA ENFERMEDAD DE WILSON: A PROPÓSITO DE UN CASO

Autores: Irene Hidalgo Mayoral^{1,2}, Irene Gómez Manjón¹, Ana Arteché López¹

¹Servicio de Genética, Hospital 12 de Octubre, Madrid

²Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Palabras clave: Enfermedad de Wilson, Cobre, Genética

EXPOSICIÓN DEL CASO

Paciente de 20 años diagnosticada de enfermedad de Wilson en el año 2011, sin estudio genético. Criterios diagnósticos: hipertransaminemia, ceruloplasmina 2.77 mg/dl, cupruria 36 µg/24 h, biopsia hepática compatible (hepatopatía crónica con formación de septos y esteatosis) y cuantificación de cobre en tejidos de 1282 µg/gramos de tejido seco. A principios de 2020 es derivada a la consulta de genética para realizar el estudio genético molecular del gen *ATP7B*, con el objetivo de llegar a un diagnóstico certero de enfermedad de Wilson y poder ofrecer un adecuado consejo genético a la familia.

ENFERMEDAD DE WILSON

La enfermedad de Wilson (EW) es un trastorno genético autosómico recesivo multisistémico del metabolismo del cobre, producida por variantes bialélicas en el gen *ATP7B*. Da lugar a un cuadro clínico variable secundario a la acumulación de un exceso de cobre en el organismo, con manifestaciones neurológicas, hepáticas y/o psiquiátricas que aparecen en edades comprendidas entre los 3 y los 60 años. El diagnóstico precoz es esencial para prevenir el daño asociado a la acumulación de cobre en el organismo y evitar la progresión de la enfermedad, y se basa fundamentalmente en la detección de concentraciones bajas de ceruloplasmina

en suero y en el incremento de los niveles de cobre en orina y/o en tejido hepático.

La EW presenta una incidencia aproximada de 1/30.000 individuos, y se estima que 1 de cada 90 individuos es portador de una variante en el gen *ATP7B*. El gen *ATP7B* es el único gen descrito actualmente asociado a EW. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 13 (13q14.3) y está compuesto por 21 exones que codifican una ATPasa transmembrana transportadora de cobre 2, implicada en la incorporación del cobre a la ceruloplasmina y en su transporte fuera del hepatocito a la bilis. Se trata de una proteína constituida por 1465 aminoácidos distribuidos en una región N-terminal citosólica de unión a metal (DUM), un dominio A con función fosfatasa, un dominio P de fosforilación, un dominio N de unión a ATP y un dominio M compuesto por 8 canales transmembrana¹.

La región citosólica de unión al cobre está compuesta por 6 dominios de unión a metal (DUM), cada uno de los cuales presenta una estructura *ferredoxin-like* de aproximadamente 70 aminoácidos que ha sido determinada por espectroscopia mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Cuentan con un motivo muy conservado GM(T/H)CxSCxxxIE, responsable de la unión de los iones de cobre a través de dos residuos de cisteína. En la Figura 2 se muestra el alineamiento de las secuencias de los 6 DUM realizado mediante la herramienta Clustal Omega (1.2.4), en el que

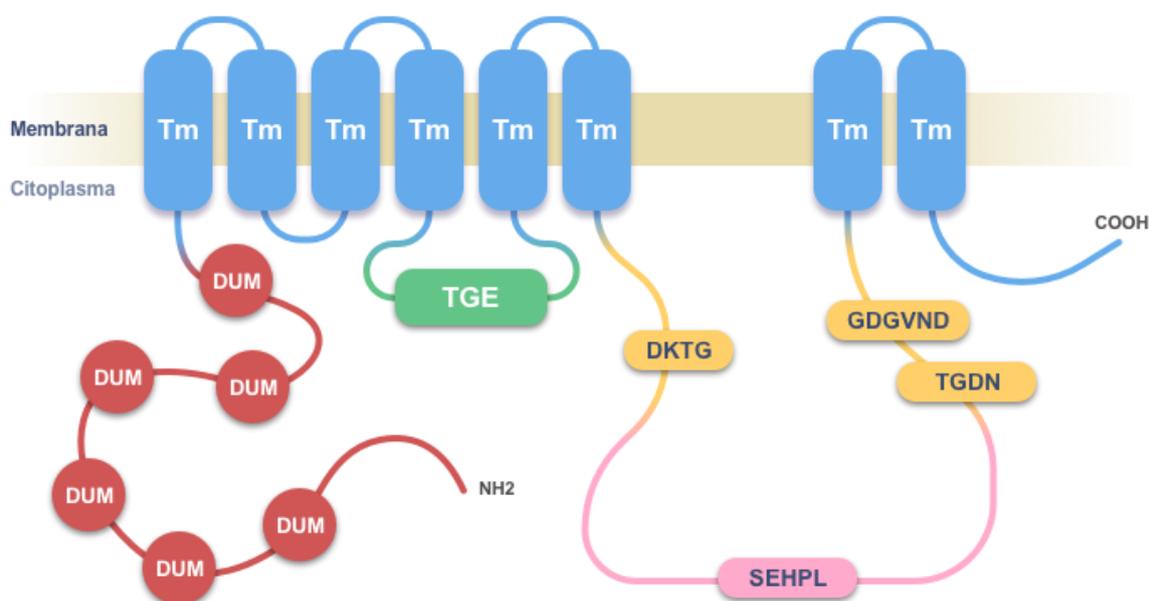


Figura 11. Estructura de la proteína codificada por el gen *ATP7B*. Rojo: Región N-terminal; Azul: dominio M; Verde: dominio A; Amarillo: dominio P; Rosa: dominio N. Se han remarcado los motivos aminoácidos funcionalmente relevantes de cada dominio. Elaboración propia, adaptada de Chang *et al*, 2017

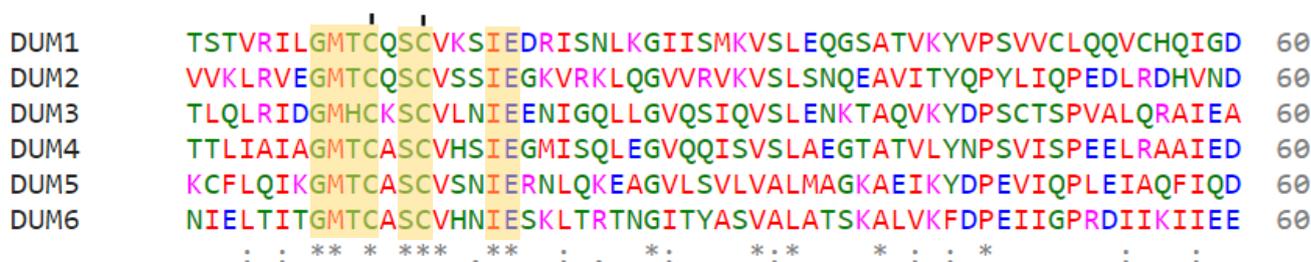


Figura 12. Alineamiento global múltiple de los primeros 60 aminoácidos de los DUM. Elaboración propia

puede observarse el grado de conservación del motivo entre los DUM. Los residuos de cisteína implicados en la unión del cobre han sido señalados.

- ¿Cuándo se debe sospechar?

La EW puede presentarse a cualquier edad entre los 3 años y los 60 años (media de edad 13 años), aunque no suele ser sintomática antes de los 5 años. Debe sospecharse:

En individuos con alteración de la función hepática sin causa conocida

La presentación de los síntomas hepáticos puede ser muy variable, oscilando desde asintomática con un aumento de transaminasas, hasta hepatitis crónica y cirrosis. Puede cursar además con insuficiencia hepática aguda, siendo muy sugerente de EW cuando va acompañada de niveles de fosfatasa alcalina en suero bajos.

Síntomas/signos clínicos típicos		Puntuación	Otras pruebas/test	Puntuación	
Anillo Kayser-Fleischer	Presente	2	Cobre hepático (en ausencia de colestasis)	>5 x LSN (>4 µmol/g)	2
	Ausente	0		0,8-4 µmol/g	1
Síntomas neuropsiquiátricos (o RM típica)	Severos	2		<0,8 µmol/g	-1
	Moderados	1		Tinción Rodamina +	1
	Ausentes	0	Normal	0	
Ceruloplasmina sérica	>0,2 g/L	0	Cobre orina 24h (en ausencia de hepatitis aguda)	1-2xLSN	1
	0,1-0,2 g/L	1		>2xLSN	2
	<0,1 g/L	2		Normal, >5xLSN tras D-penicilamina	2
Anemia hemolítica Test Coombs negativo (Cobre sérico elevado)	Presente	1	Genética (ATP7B)	2 VP y/o VPP en trans	4
	Ausente	0		1 VP/VPP	1
				No VP/VPP	0
Puntuación total		Evaluación			
>4		Diagnóstico muy probable de EW			
3		Posible EW, se necesitan más pruebas/test			
<2		Diagnóstico muy improbable de EW			

Tabla 1. Sistema de puntuación de EW. LSN: límite superior de la normalidad; VP: variante patogénica; VPP: variante probablemente patogénica. Adaptado de Ferenci *et al*, 2003

En la infancia la EW debe considerarse en el diagnóstico diferencial de otras patologías en niños mayores de un año con cualquier síntoma de afectación hepática, que varía desde una elevación asintomática de transaminasas a cirrosis con hepatoesplenomegalia y ascitis.

El estudio de la función hepática debe incluir niveles de transaminasas plasmáticas, bilirrubina total y conjugada, fosfatasa alcalina y tiempo de protrombina/INR.

En individuos con trastornos neurológicos, psiquiátricos o del comportamiento

Suelen aparecer en la segunda o tercera década de la vida, aunque se han reportado en niños menores de 10 años. La presentación neurológica abarca un amplio espectro de trastornos, incluyendo distonía, disartria, temblor y rigidez ("parkinsonismo juvenil"). Los síntomas conductuales y psiquiátricos son comunes, y en muchos casos son frecuentemente mal diagnosticados como problemas del comportamiento asociados con la pubertad: menor rendimiento escolar, cambios en la personal, impulsividad, estado de ánimo lábil, etc.

En adolescentes la EW debe ser considerada en el diagnóstico diferencial de trastornos cognitivos, psiquiátricos o de movimiento inexplicables.

- **Diagnóstico**

El diagnóstico definitivo de EW se establece combinando el diagnóstico clínico, bioquímico y genético². En el año 2001 durante la VIII Reunión Internacional sobre EW, un comité internacional de expertos propuso un sistema de puntuación que permitía establecer un punto de corte diagnóstico de la enfermedad.

Anillo de Kayser-Fleischer

Depósito de cobre en la membrana de Descemet de la córnea, que pueden observarse mediante un estudio oftalmológico con lámpara de hendidura. Se encuentra casi siempre presente en individuos con manifestaciones neurológicas o psiquiátricas y tan sólo en un 50% de los individuos con manifestaciones hepáticas. La ausencia del anillo de Kayser-Fleischer no descarta el diagnóstico de EW.

Síntomas neurológicos

Solo se necesitan estudios detallados de imágenes por resonancia magnética o de electroencefalograma si los síntomas neurológicos no pueden excluirse con certeza mediante un examen clínico-neurológico.

Ceruloplasmina sérica

La ceruloplasmina es una proteína de fase aguda, implicada en el transporte del 90% del cobre circulante. Las concentraciones en sueros son bajas en el neonato, y van aumentando gradualmente con la edad, razón por la que la edad mínima deseable para su medición ante sospecha de EW es 1 año.

La ceruloplasmina sérica medida por el ensayo nefelométrico (método utilizado en la mayoría de los hospitales) puede estar en el rango normal en pacientes con enfermedad hepática activa, en mujeres que usan anticonceptivos hormonales y durante el embarazo. El ensayo oxidativo es

más preciso, pero no se está disponible en todos los laboratorios.

Test de Coombs negativo con anemia hemolítica

La anemia hemolítica puede presentarse como una de las manifestaciones iniciales en algunos casos y es especialmente llamativa en casos de EW fulminante.

Cobre hepático en ausencia de colestasis

La medición del contenido de cobre hepático (por espectroscopía de masas o espectroscopía de absorción atómica) es la prueba más fiable para el diagnóstico de la EW, si bien un contenido de cobre hepático normal no excluye la EW. Muchos pacientes con enfermedad hepática crónica, en particular aquellos con colestasis, presentan niveles elevados en ausencia de EW.

La tinción histoquímica de cobre (por rodamina) no sustituye a la determinación cuantitativa de cobre. Menos del 10% de los casos confirmados de EW tenían gránulos positivos para rodamina en los hepatocitos).

En la mayoría de los pacientes afectos se detectan concentraciones >250 µg/g de tejido. Los pacientes portadores heterocigotos pueden presentar concentraciones entre 50-250 µg/g.

Cobre en orina

La determinación de la excreción urinaria de cobre requiere el uso de recipientes sin cobre y, en los niños, la recolección de orina de 24 h puede requerir el ingreso en un centro pediátrico.

La excreción de cobre en orina de 24 h puede ser normal en niños y en hermanos asintomáticos. En estos casos, se justifica la medición de la excreción de cobre en orina de 24 h después de una provocación oral con D - penicilamina (500 mg administrados al principio y 500 mg administrados después de 12 h).

Estudio genético de variantes patogénicas o probablemente patogénicas en el gen *ATP7B*

A día de hoy, se han reportado más de 600 variantes deletéreas en el gen *ATP7B*. La mayoría son variantes de tipo *missense* cuyo mecanismo de patogenicidad se debe a una pérdida de función por inactivación de la proteína resultante. También se han reportado también múltiples variantes truncantes y en menor medida alteraciones infrecuentes como deleciones del gen completo, variantes de la región promotora y disomías monogénicas¹.

La distribución de variantes varía entre áreas geográficas, habiéndose descrito una mayor prevalencia de variantes específicas en ciertas poblaciones: p.H1069Q (Europa Central y Oriental), p.Met645Arg (España), c. -441_-427del15 (Cerdeña), o la p.Arg778Leu (China, Corea y Taiwán).

Si bien la existencia de correlación entre el tipo de variante identificada y el cuadro clínico del individuo (correlación genotipo-fenotipo) aún no ha sido bien establecida, se ha descrito que la mayoría de las variantes patogénicas identificadas en pacientes presintomáticos o con síntomas hepáticos se localizan en los dominios M y N de la proteína, y que las variantes causantes de la pérdida de actividad

completa de la proteína se asocian a un cuadro más severo, de presentación predominantemente hepática y edad de debut temprana. La EW presenta una expresión fenotípica muy variable entre individuos con la misma alteración e individuos de la misma familia, que puede atribuirse a factores epigenéticos no conocidos¹.

Es importante resaltar que la no identificación de variantes deletéreas en el gen *ATP7B* no excluye el diagnóstico de EW. Sin embargo, la identificación de las mismas en un individuo con un diagnóstico clínico no concluyente por ausencia de síntomas típicos sí permite alcanzar un diagnóstico de certeza.

- **Tratamiento**

El tratamiento se basa en la eliminación del exceso de cobre mediante agentes quelantes como la D-penicilamina o Trientine, o el bloqueo de su absorción intestinal con sales de zinc. El tratamiento es de por vida, y debe iniciarse tras el diagnóstico en niños presintomáticos identificados por *screening* familiar a los 2-3 años de vida, e inmediatamente en niños sintomáticos para prevenir la progresión del daño hepático y/o neurológico, recomendándose evitar los alimentos ricos en cobre como hígado, patés, frutos secos, marisco y chocolate hasta la remisión de los síntomas o anomalías bioquímicas. El pronóstico es excelente en la mayoría de los casos con una buena adherencia al tratamiento, y se estima que menos del 1% requieren trasplante hepático.³

RESOLUCIÓN DEL CASO

Se realizó un estudio mediante secuenciación masiva del exoma completo (kit xGen Exoma Panel v1.0), filtrando el análisis para el gen *ATP7B* para el que se obtuvo una cobertura a una profundidad de lectura >20X del 100%) y priorizando y clasificando las variantes de acuerdo a los criterios establecidos por la ACMG (American College of Medical Genetics).⁴

Se identificó la presencia de las variantes patogénicas c.2395C>T (p.Gln799Ter) y c.1934T>G (p.Met645Arg) en el gen *ATP7B* (NM_000053.3).

- **c.2395C>T (p.Gln799Ter)**

La variante consiste en la transición de una citosina por una timina que produce, presumiblemente, la aparición de un codón de parada prematura en el *ARNm*. Como consecuencia, el *ARNm* podría ser degradado por un mecanismo de degradación mediado por variantes sin sentido (*nonsense mediated decay*; NMD) o bien podría sintetizarse una proteína no funcional truncada en aproximadamente 46% de su secuencia. La variante no se encuentra presente en las bases de datos poblacionales consultadas y no ha sido reportada previamente en la literatura científica. Sin embargo, la pérdida de función del gen *ATP7B* es un mecanismo molecular conocido asociado a enfermedad de Wilson.

- **c.1934T>G (p.Met645Arg)**

La variante consiste en la transversión de una timina por una guanina que conlleva la sustitución de un residuo de metionina por una arginina en la posición 645 de la proteína

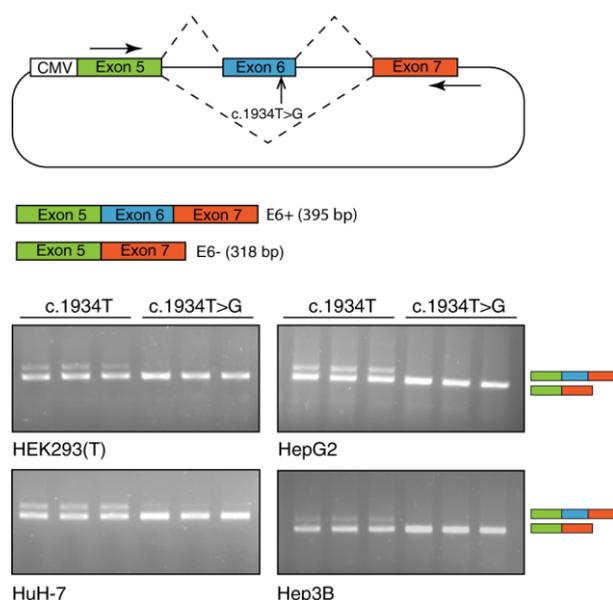


Figura 13. Análisis de minigen de la variante c.1934T>G en cuatro líneas celulares diferentes (HEK293T, HepG2, HuH-7 y Hep3B). Tomada de Merico *et al*, 2020

resultante. La variante está presente en las bases de datos poblacionales con una frecuencia del 0.05% en *gnomAD*, no habiéndose identificado ningún homocigoto en una cohorte de aproximadamente 145.000 individuos.

Si bien el análisis mediante herramientas bioinformáticas no es concluyente con respecto a su patogenicidad, se trata de una variante prevalente en España, que ha sido descrita múltiples veces en la literatura científica en pacientes con enfermedad de Wilson, especialmente en heterocigosis compuesta con variantes truncantes o tipo *missense*. Margarit E *et al*. (2005)⁵ propusieron la existencia de una correlación genotipo-fenotipo para esta variante al identificar que 22 pacientes de una cohorte de 40 individuos afectados, heterocigotos compuestos para esta variante y una segunda variante truncante presentaban una edad de debut inferior a los que presentaban una segunda variante en heterocigosis compuesta de tipo *missense*.

Recientemente el grupo de trabajo de Merico *et al*. (2020)⁶ ha demostrado su patogenicidad mediante la construcción de un modelo minigen con la variante en cuatro líneas celulares diferentes. Un minigen es una construcción artificial que reproduce un fragmento funcional de menor tamaño de un gen, y que se utiliza, entre otras aplicaciones, para realizar estudios de *splicing*. El diseño del minigen de Merico *et al*. incluía los exones 5,6 (en el que se localiza la variante) y 7 del gen *ATP7B*, y como puede observarse en la figura 3 permitió determinar que la presencia de la variante produce un *skipping* (omisión) del exón 6. Como resultado, se produce una alteración del marco de lectura del *ARNm*, un truncamiento prematuro de la proteína y una disminución de su expresión que evidencian la patogenicidad de la variante.

Con el fin de establecer la fase de las variantes se solicitó el estudio de segregación mediante la técnica de secuenciación Sanger, que permitió determinar que cada una de ellas había sido heredada de uno de los progenitores. Por tanto, la paciente es heterocigota compuesta para las variantes patogénicas c.2395C>T (p.Gln799Ter) y c.1934T>G

Síntomas y signos clínicos típicos		Puntuación
Anillo Kayser-Fleischer	Ausente	0
Síntomas neuropsiquiáticos (o RM típica)	Ausentes	0
Ceruloplasmina sérica	<0,1 g/L	2
Test Coombs negativo con anemia hemolítica (Cu sérico elevado)	Ausente	0
Cu hepático (en ausencia de colestasis)	>5 x LSN (>4 µmol/g)	2
Cu orina 24h (en ausencia de hepatitis aguda)	1-2xLSN	1
Estudio genético gen <i>ATP7B</i>	Dos VP y/o VPP en <i>trans</i>	4
Puntuación total	Evaluación	
>4	Diagnóstico muy probable de EW	

Tabla 2. Score de la paciente. Elaboración propia

(P.Met645Arg) en el gen *ATP7B*, compatible con su cuadro clínico de Enfermedad de Wilson.

En base al estudio genético realizado pudo diagnosticarse con certeza a la paciente que, de acuerdo al sistema de puntuación de Ferenci, contaba con un diagnóstico muy probable de EW.

Una vez establecido el diagnóstico de EW se cita a la paciente en consulta de consejo genético junto con sus padres para realizar un adecuado asesoramiento genético. Se les explica que la EW sigue un patrón de herencia

autosómico recesivo, es decir, las dos copias del gen tienen que estar alteradas para que aparezca la enfermedad. Dado que las dos variantes han sido heredadas, los hermanos de la paciente tienen un 25% de probabilidades de ser afectados, un 50% de ser portadores de alguna de las variantes y un 25% de probabilidades de no ser portadores de ninguna de las dos variantes. Con el fin de conocer su condición se solicitó el estudio de segregación en los hermanos, que resultaron ser ambos portadores de una variante cada uno.

Dado que la paciente es heterocigota compuesta para dos variantes patogénicas en *ATP7B*, todos sus hijos serán portadores obligados de una de las dos variantes, mientras que en el caso de sus hermanos, portadores asintomáticos, presentan un 50% de probabilidades de transmitir la variante

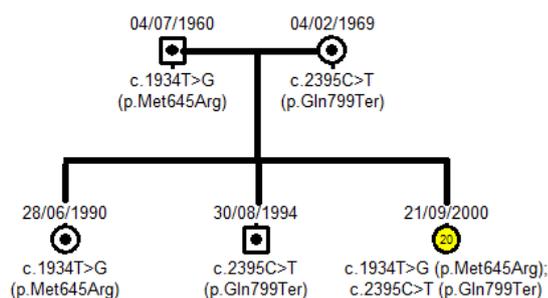


Figura 14. Árbol genealógico de la familia. Elaboración propia

a sus hijos. El riesgo de descendencia afecta dependerá del estatus de portador de sus parejas. Por ello, en el momento en que estos decidan tener descendencia estaría indicado realizar el estudio genético del gen *ATP7B* a sus parejas reproductivas, pudiendo recurrir a técnicas de diagnóstico genético prenatal, en el caso de que fueran portadoras de variantes patogénicas, para así conocer el genotipo fetal.

Se recomienda ampliar el estudio a los familiares en riesgo de ser portadores, independientemente de que presentan o no síntomas de la enfermedad. La EW puede tener un debut tardío, por lo que la ausencia de síntomas en el momento del estudio no excluye la posibilidad de que el individuo sea afecto. El diagnóstico precoz de los pacientes asintomáticos permite prevenir el daño asociado a la acumulación de cobre en el organismo y evitar secuelas.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

- Chang IJ, Hahn SH. The genetics of Wilson disease. *Handb Clin Neurol.* 2017;142:19–34.
- Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int.* 2003 Jun;23(3):139-42.
- Socha P, Janczyk W, Dhawan A, Baumann U, D'Antiga L, Tanner S, et al. Wilson's Disease in Children: A Position Paper by the Hepatology Committee of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;66(2)334–44.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–424.

5. Margarit E, Bach V, Gómez D, Bruguera M, Jara P, Queralt R, et al. Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population -- identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene. *Clin Genet.* 2005;68(1):61–8.
6. Merico D, Spickett C, O'Hara M, Kakaradov B, Deshwar AG, Fradkin P, et al. ATP7B variant c.1934T>G p.Met645Arg causes Wilson disease by promoting exon 6 skipping. *NPJ Genomic Med.* 2020;5:16.

HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA POR DÉFICIT DE 21-HIDROXILASA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y ASESORAMIENTO GENÉTICO

Autores: Rubén Pérez de la Fuente, María Teresa Sánchez Calvín, Carmen Palma Milla

Servicio de Genética, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: HSC (Hiperplasia Suprarrenal Congénita), *CYP21A2*, Diagnóstico molecular

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) es una patología de etiología genética causada por distintos déficits enzimáticos que involucran la función endocrina de la corteza suprarrenal. En más de un 95% de los casos es debida a la deficiencia enzimática de la 21-hidroxilasa (21OH, MIM#201910), enzima codificada por el gen *CYP21A2* localizado en la región cromosómica 6p21.33. La HSC por deficiencia de 21OH es una enfermedad monogénica de herencia autosómica recesiva.

Las enzimas de la corteza suprarrenal son de vital importancia para la correcta síntesis de los glucocorticoides, mineralocorticoides y las hormonas sexuales. Otras deficiencias enzimáticas mucho menos comunes que dan lugar a HSC son: 11- β -hidroxilasa (gen *CYP11B1*), 17- α -hidroxilasa (gen *CYP17A1*), 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (gen *HSD3B2*) y StAR (proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda, gen *STAR*).

La enzima 21OH cataliza dos reacciones (figura 1): la conversión de progesterona a deoxicorticosterona y la conversión 17-hidroxiprogesterona a 11-desoxicortisol. Ambos son metabolitos intermedios que dan lugar a la aldosterona (vía mineralocorticoide) y al cortisol (vía glucocorticoide), respectivamente.

El déficit de 21OH tiene como consecuencia una baja producción de aldosterona y cortisol así como la acumulación en suero de los sustratos enzimáticos, en este caso elevación de la 17-OH progesterona (debido a que la enzima 17-hidroxilasa sigue activa). Al no poder continuar adecuadamente las vías mineralocorticoide y glucocorticoide, los metabolitos intermedios son procesados por la única vía que continúa activa, la vía androgénica, aumentando la síntesis de dehidroepiandrosterona, androstenediona y testosterona.

Dependiendo del tipo de variante genética detectada y de la actividad enzimática se diferencian dos formas clínicas:

- Hiperplasia suprarrenal forma clásica (congénita): Se trata de la forma clínica más severa, la actividad enzimática es nula o casi nula, su incidencia es menor que la no clásica (1 de 10.000-15.000 individuos) y puede presentarse de dos maneras diferentes.
 1. Virilizante simple: Ocurre en el 25% de las formas clásicas. La actividad enzimática es residual y es capaz de generar suficiente aldosterona y cortisol, por lo que el metabolismo renal y de la glucosa no se encuentran comprometidos. Se produce una gran acumulación de andrógenos y como consecuencia la virilización prenatal

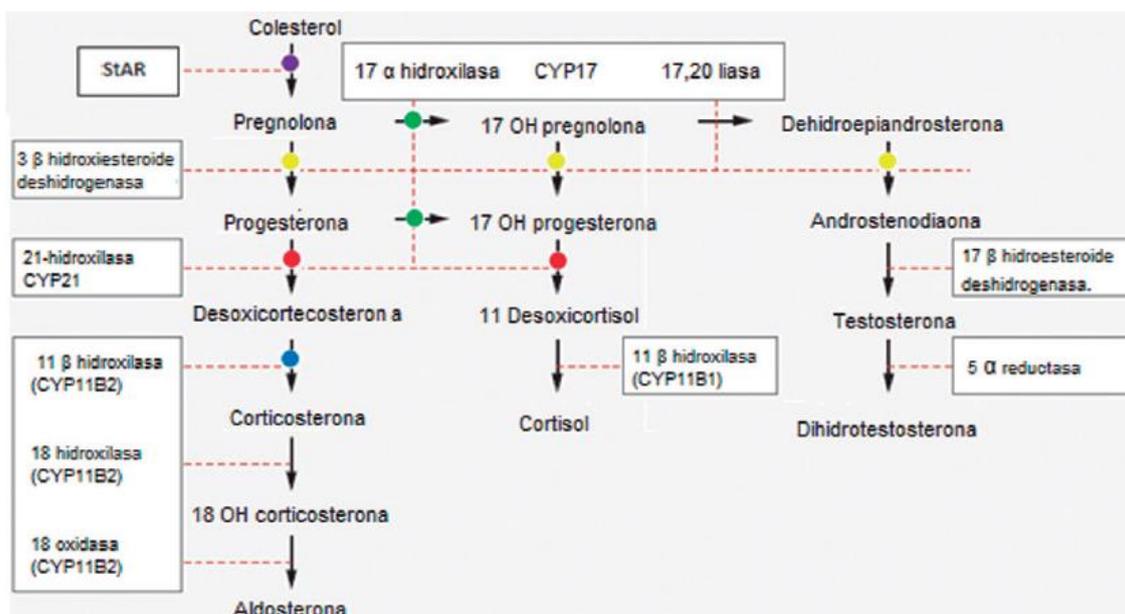


Figura 1. Principales enzimas y sustratos involucrados en la función endocrina corticoadrenal. En rojo se encuentra representada la actividad de la 21OH, cuya deficiencia es la más representada en la HSC.

Tomado de: Herrera-Gómez A, 2015

en mujeres (genitales ambiguos al nacimiento) y pubertad precoz.

2. Forma pierde sal ('*salt-wasting*'): Ocurre en el 75% de las formas clásicas. La actividad enzimática es nula y no es capaz de generar suficiente aldosterona y cortisol, comprometiendo el metabolismo renal. La falta de aldosterona provoca una inadecuada reabsorción de sodio a través del túbulo renal, lo que resulta en deshidratación, vómitos, pérdida de peso, hipotensión, hipoglucemia, hiponatremia y acidosis metabólica hiperkalémica. Estas crisis de pérdida de sal pueden comprometer la vida del paciente.
 - Hiperplasia suprarrenal forma no clásica (tardía): Se trata de una forma clínica más leve, la actividad enzimática es moderada (30-40% de actividad), su incidencia es mayor que la clásica (1 de 200-1000 individuos). La clínica se presenta durante la infancia tardía, adolescencia o edad adulta incluso puede haber individuos cuyos síntomas pasen desapercibidos. Las mujeres no presentan virilización al nacimiento, pero sí pueden presentar pubertad precoz, hirsutismo y alteraciones del ciclo menstrual. Por otro lado, los hombres pueden presentar pubertad precoz, infertilidad y oligospermia.

El diagnóstico bioquímico se realiza en base a la cuantificación de la 17 OH-progesterona (17OHP), cuyos niveles dependen del grado de deficiencia de la actividad enzimática que viene determinado por el tipo de variante genética. El diagnóstico de la forma clásica de la HSC debe realizarse al nacimiento, lo antes posible para, si fuera necesario, instaurar tratamiento de forma precoz y prevenir las crisis que amenazan la vida del recién nacido y puede dejar secuelas irreversibles, como daño cerebral secundario a la hiponatremia.

La detección precoz de HSC está recomendada en guías internacionales, basada en la determinación de 17OHP. En España son muchas las comunidades autónomas en las que esta determinación está incluida en el cribado neonatal que se realiza a las 48h de vida en sangre capilar. En España se realiza por inmunofluorescencia y si está alterado se realiza una valoración clínica y analítica del recién nacido, así como genotipado del *CYP21A2* para confirmar el diagnóstico. Los valores de normalidad varían para cada laboratorio en función de la técnica utilizada para su determinación y en función de la edad gestacional, sexo y peso al nacimiento. Se considera positivo el cribado con valores por encima del percentil 99. En recién nacidos a término, con peso adecuado a la edad gestacional, en semana 40 este valor se estima en torno a 15 nmol/L (13 nmol/L en varones y 12,10 nmol/L en mujeres) y en recién nacidos pretérmino, 36 semanas de gestación, en torno a 30 nmol/L (29,60 nmol/L en varones y 30,60 nmol/L en mujeres).

El diagnóstico de la forma no clásica ha sido establecido cuando los niveles basales de 17-OHP son superiores a 5 ng/ml en la fase folicular del ciclo menstrual. Excluyendo el período neonatal, se consideran normales valores basales inferiores a 2-3 ng/ml. En casos no concluyentes se puede realizar el test de estimulación con ACTH endovenoso con

extracción basal y a los 60 minutos post-ACTH, considerándose una respuesta normal valores de 17-OHP a los 60 min <10ng/mL. La prueba de ACTH es recomendable incluso con valores normales de 17-OHP, ya que hasta en un 10% de los casos no clásicos, los niveles basales de 17-OHP son inferiores a 2 ng/ml.

ESTRUCTURA DEL *LOCUS CYP21A2*

El gen *CYP21A2* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 junto con los genes del complejo mayor de histocompatibilidad tipo III. Esta región del cromosoma es altamente variable entre individuos (polimórfica) y varía tanto en número de copias (CNV) como en variantes genéticas de un solo nucleótido (SNV). El gen *CYP21A2* consta de 10 exones codificantes y traduce para una proteína de 495 aminoácidos.

Este gen se localiza dentro de un complejo conocido como módulo RCCX donde se encuentra el gen activo (*CYP21A2*) y un pseudogen (*CYP21A1P*) que comparte hasta un 98% de homología de secuencia. Además esta región incluye otros genes como *RP1*, *C4*, *TNXB* y sus respectivos pseudogenes *RP2* y *TNXA*. El pseudogen *CYP21A1P* se encuentra inactivo ya que en su secuencia incorpora una gran cantidad de variantes deletéreas que impiden que se traduzca a proteína funcional.

Debido a la localización y al número de regiones homólogas dispuestas en tándem es una región susceptible de que se produzcan eventos de recombinación por alineamientos erróneos. Así pues, entre gen y pseudogen existen un alto número de conversiones que pueden llevar a la inactivación del gen *CYP21A2* y producir por tanto un alelo no funcional.

Según cuantas copias en tándem del módulo se dispongan, se hablará de RCCX monomodular, bimodular, trimodular e incluso cuatrimodular. El haplotipo bimodular es el más frecuente en la población (69%) y comprende los genes-pseudogenes en la siguiente disposición: *RP1-C4A-CYP21A1P-TNXA-RP2-C4B-CYP21A2-TNXB* (ver figura 2). En este haplotipo tendremos por tanto una copia del gen y una del pseudogen. En el caso de los monomodulares (17%) no tendremos ninguna copia del pseudogen pero sí una copia del gen y en trimodulares (14%) tendremos dos copias del pseudogen y una del gen.

En la gran mayoría de estructuras RCCX el gen *CYP21A2* se encuentra adyacente a *TNXB* como está indicado en la figura 2, aunque esto no siempre es así. Se han descrito casos donde el gen puede estar duplicado y adyacente a *TNXA* (donde estaría localizado el pseudogen). También se han descrito haplotipos concretos no infrecuentes en la población con 2 copias del gen activo y 1 copia del pseudogen que se asocian a variantes patogénicas severas como son la p.Gln319* y a alelos híbridos *CYP21A2/CYP21A1P*. Estos casos concretos han de ser tenidos muy en cuenta en el diagnóstico molecular de *CYP21A2*.

Al tratarse de una región con alta tasa de recombinación pueden darse eventos de microconversión entre gen y pseudogen donde el gen adquiere parte de la secuencia del pseudogen (alelos no funcionales) o donde el pseudogen adquiere parte de la secuencia del gen (alelos funcionales),

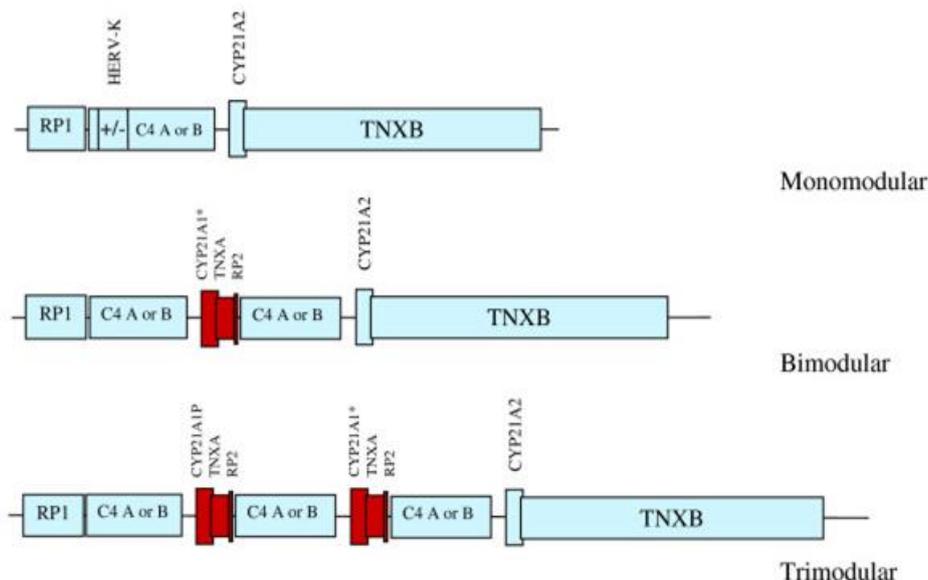


Figura 2. Reordenamientos más comunes del módulo RCCX. En rojo representados los pseudogenes inactivos (*CYP21A1P*, *TNXA* y *RP2*). Tomado de: Thayne L S *et al*, 2008

estos últimos no serían patogénicos ya que el gen se mantiene activo.

VARIANTES PATOGENICAS Y CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Existen más de 200 variantes patogénicas asociadas a déficit de 21OH, no obstante, hay una serie de alteraciones genéticas muy frecuentes en la población y asociadas a los distintos fenotipos de hiperplasia. Debido a los eventos de microconversión, un alelo no funcional puede tener presente una o más variantes patogénicas en *cis* (en el mismo cromosoma) y que derivan de la secuencia del pseudogen, por lo que siempre está recomendado el estudio genético en los progenitores.

La severidad de los signos clínicos va a depender del grado de déficit enzimático determinado por el tipo de alteración molecular presente en ambos alelos. Las formas graves de la enfermedad se dan cuando ambos alelos presentan mutaciones severas, por el contrario, las formas leves pueden darse en presencia de dos alteraciones leves o la presencia de una grave y otra leve.

Existe una buena correlación genotipo-fenotipo. Estudios funcionales han determinado que las formas pierde sal se presentan cuando la actividad enzimática es nula o <2%, las formas virilizantes simples suceden con una actividad enzimática entre el 3-7%, en las que existe una cantidad suficiente de aldosterona y las formas no clásicas cuando la actividad enzimática residual es del 20-60 %.

La delección de aproximadamente 30kb forma alelos híbridos gen-pseudogen y son muy frecuentes (en torno al 20-25% de alelos no funcionales). Existen numerosos estudios donde se reportan este tipo de alteraciones, su frecuencia y su relación fenotípica. Son conocidas como quimeras *CYP21A1P/CYP21A2* y se han descrito diferentes tipos según el punto de corte (ver figura 3).

Las variantes p.Pro31Leu y p.Val282Leu son muy frecuentes (p.Val282Leu es responsable del 70% de las no clásicas) y se encuentran asociadas a formas leves, no obstante, pueden ir acompañadas en el mismo alelo con otras variantes asociándose a fenotipos más severos, como son por ejemplo: p.Pro31Leu + microconversión de la región promotora c.[-126C>T; -113G>A; -110T>C; -103A>G] o p.Val282Leu + c.292+5G>A (variante intrónica que afecta al procesamiento del ARN mensajero).

La variante c.293-13A/C>G es de las más frecuentes en fenotipos pierde sal y se encuentra en el intrón 2 del gen. La presencia en esta posición de los nucleótidos A y C se considera normal, por el contrario, la presencia de G es patogénica ya que altera el procesamiento del ARN mensajero del gen (*splicing*). Puede encontrarse de manera habitual en el mismo alelo con la delección de 8 nucleótidos del exón 3 (c.332_339del). Aunque se han descrito casos de forma virilizante simple en homocigotos para c.293-13A/C>G, no es el fenotipo habitual.

La variante p.Ile173Asn deja como resultado un alelo deficiente pero con una actividad residual de la enzima del 1-2%. Se encuentra asociada a fenotipo clásico virilizante simple. No obstante, ha sido descrita en algunos casos asociada a pérdida salina en heterocigosis compuesta con una variante severa.

Las variantes p.[Ile237Asn; p.Val238Glu; p.Met240Lys] son conocidas como *cluster* del exón 6, suelen ir en conjunto e imposibilitan la unión enzima-sustrato. Se encuentran asociadas a fenotipos severos de pérdida salina.

La variante p.Gln319* provoca un codón de parada prematuro en la traducción y se encuentra asociado con formas clásicas pierde sal. No obstante, en el 85% de los casos donde se identifica esta mutación, coexiste con una duplicación completa funcional del gen *CYP21A2* (haplotipo relativamente frecuente en población general). Esto podría

resultar en falsos positivos ya que una persona portadora de un gen funcional y una copia duplicada con una variante patogénica en el mismo cromosoma puede ser etiquetada incorrectamente de portadora. Serían necesarios estudios adicionales para confirmar que esta copia extra es funcional y por tanto el alelo no es patogénico.

Nucleótido	Aminoácido	Nomenclatura clásica	Fenotipo asociado
Deleción 30kb (alelos híbridos) Microconversiones <i>CYP21A1P/CYP21A2</i>			Clásica pierde sal
c.92C>T	p.Pro31Leu	P30L	No clásica o leve
c.293-13A/C>G	-	IVS2-13A/C>G 655AG	Clásica pierde sal/virilizante simple
c.332_339del	p.Gly111Valfs*21	del8pb	Clásica pierde sal
c.518T>A	p.Ile173Asn	I172N	Clásica virilizante simple
c.710T>A; c.713T>A; c.719T>A	p.Ile237Asn; p.Val238Glu; p.Met240Lys	<i>Exón 6 cluster</i>	Clásica pierde sal
c.844G>T	p.Val282Leu	V281L	No clásica o leve
c.923dupT	p.Leu308Phefs*6	F306+T	Clásica pierde sal
c.955C>T	p.Gln319*	Q318X	Clásica pierde sal
c.1019G>A	p.Arg340His	R339H	No clásica o leve
c.1069C>T	p.Arg357Trp	R356W	Clásica pierde sal/virilizante simple
c.1273G>A	p.Gly425Ser	G424S	Clásica virilizante simple
c.1280G>A	p.Arg427His	R426H	Clásica pierde sal/virilizante simple
c.1360C>T	p.Pro454Ser	P453S	No clásica o leve

Tabla 1. Alteraciones frecuentes en el gen *CYP21A2* y fenotipos asociados. Adaptado de: Rodríguez A *et al*, 2019

GENOTIPADO DE *CYP21A2*

Teniendo en cuenta la gran variabilidad interindividual se requiere una gran experiencia del *locus* a la hora de interpretar resultados, así como recurrir al manejo de distintas técnicas moleculares y la realización de estudios de segregación en progenitores para dar un diagnóstico

molecular definitivo y/o un adecuado asesoramiento genético.

Es altamente recomendable el estudio adicional en progenitores a la hora de obtener un resultado positivo (una o más variantes patogénicas identificadas), ya que por eventos de microconversión gen-pseudogen es frecuente encontrar 2 o más variantes patogénicas en el mismo alelo (configuración *cis*) y esto no es suficiente para determinar un diagnóstico molecular de déficit de 21OH. Como en cualquier patología autosómica recesiva, es necesario identificar una variante patogénica en cada alelo de gen (configuración *trans*), por ello se debe de ampliar el estudio de las variantes detectadas en los progenitores del paciente antes de dar un resultado molecular definitivo.

El estudio de *CYP21A2* se puede completar en paralelo con un estudio indirecto mediante análisis de fragmentos con microsatélites (STR) localizados en la región HLA y próximos al locus *RCCX* que por desequilibrio de ligamiento se transmiten a la descendencia en conjunto y nos dan una idea del alelo que se está transmitiendo al paciente además de detectar posibles casos de consanguinidad no conocida (confirmación de haplotipos homocigotos). Debido a la complejidad del locus y a la gran homología que comparte con el pseudogen, es necesario asegurarse una amplificación específica mediante PCR o Long-PCR con cebadores específicos que hibriden sólo en el gen. Para poder minimizar los falsos positivos y negativos se tienen que optimizar adecuadamente las condiciones de PCR y además realizar estudios confirmatorios mediante técnicas complementarias o amplificando por PCR con otros cebadores alternativos. Como primera estrategia se puede realizar un cribado de las variantes patogénicas más frecuentes (vistas anteriormente) que cubre el 95% de los diagnósticos y completar si fuese necesario el número de copias del gen/pseudogen o incluso realizar la secuenciación completa. No es recomendable realizar NGS (secuenciación masiva) para el estudio de *CYP21A2* debido al número variable de copias de pseudogenes y a la gran homología de secuencia.

El estudio del gen *CYP21A2* se puede abordar de 3 maneras diferentes: Estudio dirigido a las variantes más frecuentes, estudio del número de copias (deleciones/duplicaciones) y estudio del gen completo. Para el estudio dirigido a la detección de variantes frecuentes se pueden utilizar técnicas como: Hibridación específica de alelo (ASO-PCR), PCR y digestión mediante enzimas de restricción, PCR específica de alelo (ARMS-PCR) y minisequenciación. Para el estudio del número de copias se pueden utilizar técnicas como: Southern Blot (SB), amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación (MLPA) y PCR a tiempo real o cuantitativa (RT-PCR). Para el estudio del gen completo se puede utilizar secuenciación Sanger.

ESTUDIO DE MUTACIONES FRECUENTES

En la ASO-PCR o hibridación específica de alelo se generan amplificados específicos del gen mediante PCR y posterior transferencia a una membrana de nylon o nitrocelulosa (*dot blot*). Después estos fragmentos son hibridados con sondas marcadas de unos 19-22 nucleótidos que testan las regiones

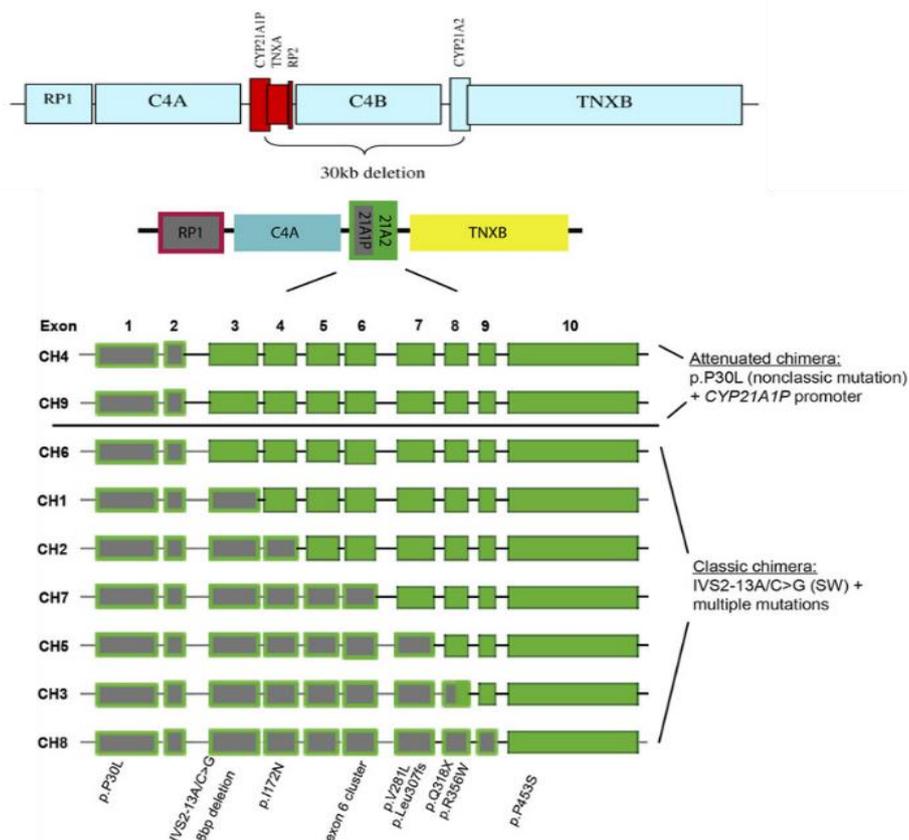


Figura 3. Formación de alelos híbridos (quimeras) por delección de aproximadamente 30kb y clasificación según su punto de corte. Tomada de: Hannah-Shmouni F *et al*, 2017

de interés (una sonda híbrida en la secuencia *wild type* y otra sonda en la secuencia mutada), finalmente reveladas e interpretadas.

En la minisequenciación un cebador se hibrida al ADN junto al sitio de la variante que se desea 'interrogar'. Se añaden 4 dideoxirribonucleótidos (ddNTPs) marcados con cuatro fluorocromos diferentes sin añadir ningún dNTP, para que sólo se incorpore el fluorescente y se pare la reacción. La base que se añade en la reacción será la complementaria a la cadena y el fluorocromo es visualizado por análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar. Este método puede ser optimizado en una reacción multiplex con cebadores de tamaño variable añadiendo en el extremo 5' del cebador una secuencia (por ejemplo: poliT) para poder separarlos y facilitar su identificación en la electroforesis capilar (ver figura 4).

La ASO-PCR y la minisequenciación son de los métodos más utilizados para el estudio de mutaciones frecuentes ya que permiten valorar una gran cantidad de muestras simultáneas. Son métodos rápidos, coste-efectivos, con alto rendimiento y detectan microconversiones. No obstante, sólo permiten determinar la presencia/ausencia de aquellas variantes para los que son diseñados y no permiten detectar variantes nuevas.

ESTUDIO DEL NÚMERO DE COPIAS (DELECCIONES Y/O DUPLICACIONES)

El MLPA (amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación) consiste en un método semicuantitativo que permite determinar el número de copias de un gen o región de interés. Los kits están diseñados con sondas específicas para el gen e hibridan en la mayoría de exones codificantes. Después de la hibridación estas sondas son ligadas, de tal modo que solo van a ser amplificadas si la ligación ha sido correcta (cada sonda es doble e hibrida en regiones contiguas). Una vez ligadas son amplificadas en una reacción multiplex por cebadores universales en los extremos, los fragmentos resultantes son analizados por electroforesis capilar mediante una comparativa de la fluorescencia con respecto de muestras controles. El número de productos de ligación de la sonda es pues una medida del número de secuencias diana presentes en la muestra. En el caso del kit de MLPA para *CYP21A2* las sondas son diseñadas para hibridar y ligarse en las regiones donde existen las diferencias nucleotídicas entre gen y pseudogen, de este modo permiten analizar el número de copias tanto del pseudogen como del gen (locus *RCCX*), además permiten visualizar las posibles microconversiones y sus puntos de corte entre *CYP21A1P* y *CYP21A2*. Si bien es una técnica robusta tiene sus limitaciones como: sensibilidad a contaminantes, incapacidad para detectar anomalías a nivel de célula única, no tienen sondas diseñadas para todas las mutaciones frecuentes, sensibilidad a nuevas variantes

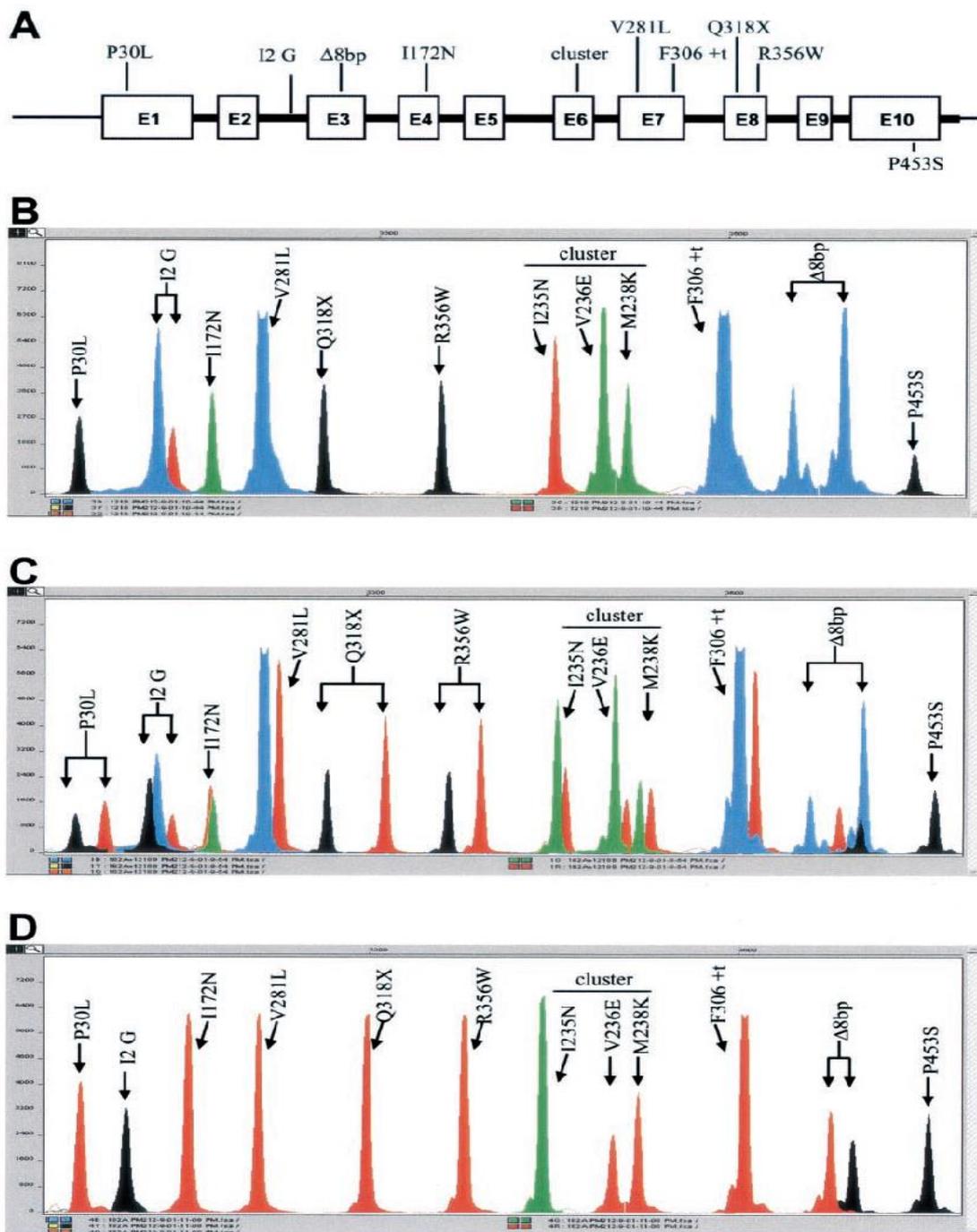


Figura 4. Análisis mediante minisequenciación de las mutaciones frecuentes en el gen *CYP21A2*. (A) Esquema de las 9 mutaciones estudiadas en el ensayo. (B) Resultado negativo para las mutaciones frecuentes estudiadas, todas ellas homocigotas para *wild type*, excepto el polimorfismo A/C del intrón 2 que se encuentra en heterocigosis. (C) Mezcla de amplificados para gen y pseudogen que revela todas las variantes en heterocigosis (excepto la P453S que no deriva del pseudogen). (D) Resultado de amplificación específica de pseudogen que revela todas las mutaciones patogénicas en homocigosis, excepto P453S. Tomado de: Krone N *et al*, 2002

cerca de un sitio de ligación de sonda que pueden generar falsos positivos y las duplicaciones en un alelo pueden enmascarar deleciones en el otro. El MLPA es una buena opción como técnica complementaria y es necesaria una

interpretación conjunta a métodos como minisequenciación, ASO-PCR o secuenciación Sanger.

ESTUDIO DEL GEN COMPLETO

La secuenciación Sanger todavía se utiliza ampliamente para la secuenciación de fragmentos individuales de ADN. El fragmento de interés es amplificado mediante PCR para obtener suficiente producto de partida, luego se purifica para obtener sólo el fragmento de doble cadena y eliminar *primer* residual y finalmente se realiza una segunda PCR (reacción Sanger) pero utilizando ddNTP (didesoxinucleótidos) de los cuatro nucleótidos (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), cada uno etiquetado con un fluorocromo de diferente color, y a menor concentración que los dNTPs normales. Una vez que se ha agregado un didesoxinucleótido a la cadena, no hay hidroxilo disponible y no se pueden agregar más nucleótidos. La cadena termina con el didesoxinucleótido, que está marcado con un color particular dependiendo de la base (A, T, C o G) que porta. Por último, estos fragmentos son separados por tamaño mediante electroforesis capilar y la fluorescencia es captada por un láser. Hoy en día, con el equipo y los materiales adecuados, secuenciar un fragmento corto de ADN es relativamente sencillo.

El abordaje mediante Sanger para *CYP21A2* ha sido publicado con numerosas y variadas estrategias en la bibliografía. Los cebadores deben ser diseñados con cautela y es recomendable el estudio del gen mediante fragmentos de PCR solapantes de tal modo que múltiples variantes patogénicas queden cubiertas por dos amplicones diferentes. Se puede realizar una Long-PCR con cebadores específicos que hibridan en el gen *TNXB* (gen adyacente al *CYP21A2*) y después realizar PCR secundarias (*nested PCR*) en diferentes fragmentos. También pueden aprovecharse las diferencias nucleotídicas que difieren con el pseudogen para el diseño de cebadores (como son el *cluster* del exón 6 o la delección de 8 nucleótidos del exón 3). Este método es muy efectivo en cuanto a detección de nuevas variantes patogénicas y la detección de los puntos de corte de la quimera *CYP21A1P/CYP21A2*. No obstante, existen riesgos de falsos positivos y negativos si los cebadores no están bien diseñados o si el locus *RCCX* a estudiar es altamente complejo, por ello en muchos casos es necesario el estudio complementario con otras técnicas como es el MLPA para evaluar las dosis de gen/pseudogen y confirmar eventos de microconversión que sean identificados.

ASESORAMIENTO GENÉTICO

El asesoramiento de la HSC está indicado en portadores y afectados de variantes severas en *CYP21A2*. La correlación genotipo-fenotipo en esta enfermedad es alta:

- La presencia de dos variantes leves o una variante severa y una leve se manifestará como forma no clásica o tardía.
- En los portadores de dos variantes severas la enfermedad puede manifestarse como forma clásica con virilización prenatal en niñas recién nacidas (se recomienda iniciar tratamiento en las primeras 6-8 semanas de gestación) o el grave síndrome pierde sal de aparición en las primeras semanas de vida.

El patrón de herencia de esta enfermedad es autosómico recesivo, es decir, requiere una variante patogénica en cada uno de los dos alelos del gen (homocigosis o heterocigosis compuesta) para que se manifieste la enfermedad.

Los progenitores de un afecto, en la mayoría de los casos, son portadores heterocigotos obligados de una variante en el gen *CYP21A2* y en esta situación, tienen un riesgo de descendencia afecta del 25%, de descendencia portadora heterocigota sana del 50% y un 25% que no portan ninguna variante de sus progenitores.

Los heterocigotos son asintomáticos, pero pueden tener niveles de 17-OHP ligeramente elevados cuando se estimulan con ACTH, en comparación con los individuos con dos alelos normales. Puede ocurrir que, a raíz de este estudio, se identifique que un progenitor fuera afecto de una forma no clásica no diagnosticada.

Aproximadamente el 1% de las variantes patogénicas de *CYP21A2* en un probando ocurren de *novo*, es decir, uno de sus progenitores no es portador de ninguna de las variantes de su hijo afecto. En esta situación no se puede excluir la existencia de un mosaicismo germinal en este progenitor (es decir, que la variante esté presente en un porcentaje de sus gametos), por lo que el riesgo de descendencia afecta en esta pareja se estima un 1% superior al de la población general.

Un individuo afecto (2 variantes patogénicas en heterocigosis compuesta en el gen *CYP21A2*) transmite siempre una variante patogénica a su descendencia por lo que el riesgo de descendencia afecta dependerá del estado de portador de su pareja reproductiva. Una de cada 9-10 personas de la población general es portadora heterocigota de una variante leve y 1/50-60 de variantes severas. Por tanto, en el momento que el afecto desee descendencia, está indicado realizar estudio molecular del gen *CYP21A2* a su pareja reproductiva para determinar si es portadora de una variante severa en dicho gen y dar un adecuado asesoramiento genético. Si su pareja fuera portadora de una variante patogénica en dicho gen el riesgo de descendencia afecta es del 50% en cada embarazo. Si la pareja no es portadora tienen riesgo de descendencia portadora asintomática de una de las variantes del afecto.

Una vez conocidas las variantes familiares, en el caso de ser variantes severas, está indicado realizar estudio de portadores a los familiares en riesgo (hermanos del afecto y padres y/o hermanos de cada uno de los progenitores del afecto) y en los que resulten portadores está indicado continuar con el resto de familiares en riesgo y recibir asesoramiento genético.

El momento óptimo para determinar el riesgo genético, aclarar el estado de portador y discutir la disponibilidad de pruebas prenatales es antes del embarazo. Está indicado realizar el estudio molecular del gen *CYP21A2* a la pareja reproductiva de los portadores de una variante severa, en el momento que deseen descendencia, para determinar si es portadora de una variante severa en dicho gen y dar un adecuado asesoramiento genético.

El diagnóstico y tratamiento prenatal: Está indicado sólo en embarazos de riesgo de la forma clásica para evitar virilización de los genitales externos en fetos de mujeres afectadas. Para ello se puede realizar estudio de ADN fetal en sangre materna que permite determinar el sexo a partir de la 6ª semana, aunque alcanza sensibilidad al 100% en la 10ª

semana. Con ello se evita el tratamiento de fetos varones pero no evita el de niñas no afectas. Para determinar el genotipo del feto se puede recurrir al diagnóstico prenatal en vellosidad corial a la semana 12 de gestación o en líquido amniótico en la semana 15-16 de gestación.

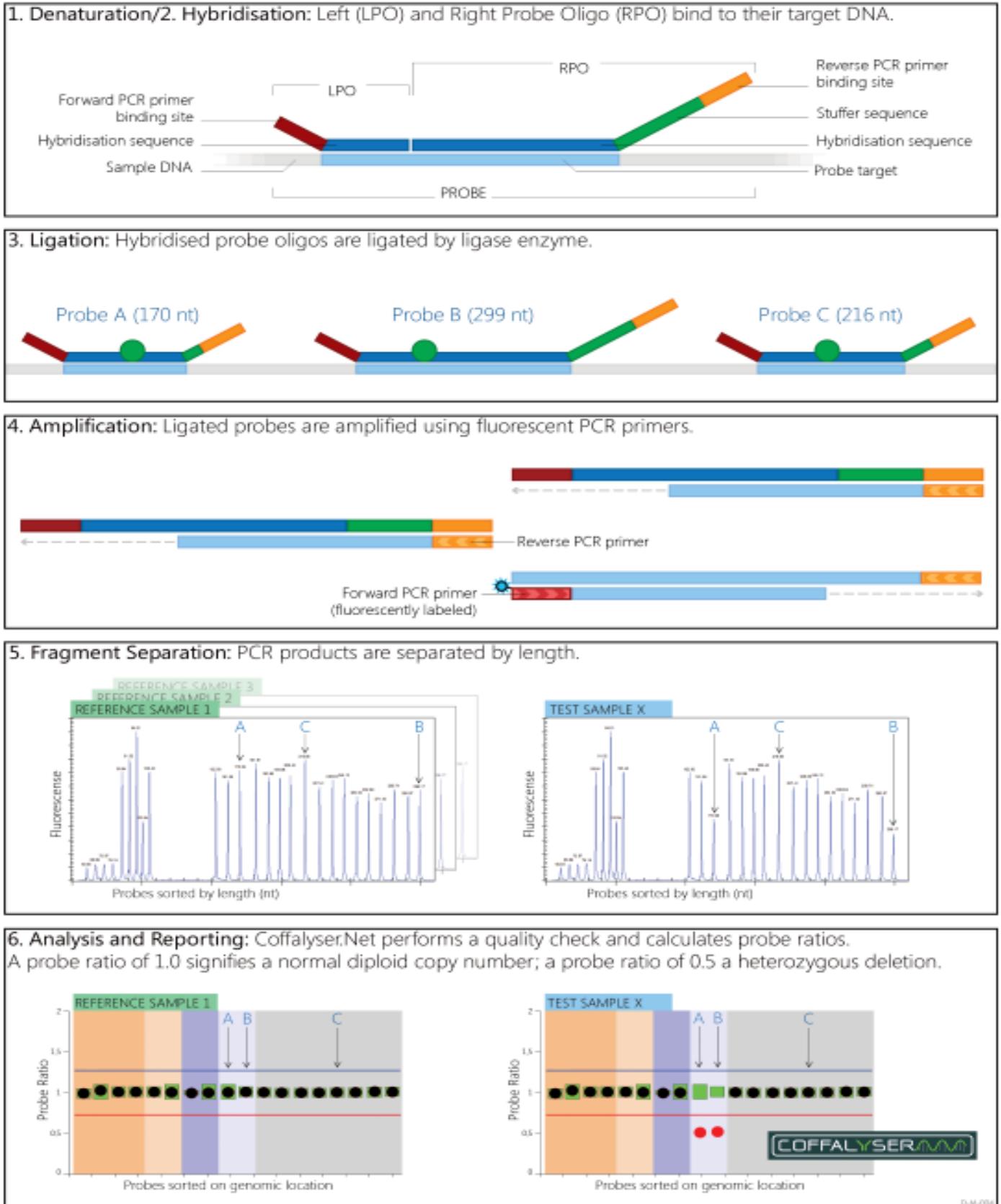


Figura 5. Ensayo de MLPA. Tomado de: <https://www.mrcholland.com>

CONCLUSIONES

- El déficit de 21-hidroxilasa, codificada por el gen *CYP21A2*, es responsable del 95% de hiperplasia suprarrenal congénita. La prevalencia en la población de este trastorno es de 1/200 en la forma leve o tardía y 1/10.000 en la forma severa o clásica.
- Es fundamental el cribado neonatal de 17-OHP para instaurar tratamiento de forma precoz y evitar la potencial mortalidad de una crisis suprarrenal y el daño cerebral irreversible secundario a la hiponatremia.
- El locus *RCCX* es una región variable donde existe un pseudogen con 98% de homología duplicado en tándem, lo que dificulta su análisis e interpretación. Un 25% de variantes patogénicas se deben a eventos de microconversión o deleciones de la región que genera alelos híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* no funcionales. A menudo es necesario el uso de varias técnicas complementarias de biología molecular para su correcto análisis e interpretación
- Ante un cribado de mutaciones positivo son requeridos estudios de segregación para determinar la fase de estas variantes y confirmar que se encuentran cada una en un alelo del gen.
- El abordaje mediante otras técnicas indirectas como estudio mediante microsatélites nos puede ayudar a interpretar estos estudios, ya sea por datos de segregación discordantes, consanguinidad no conocida o incluso confirmar filiación genética para variantes *de novo*, originadas en el 1% de los casos.
- Se requiere gran conocimiento de las variantes patogénicas frecuentes y su asociación con fenotipo severo o leve. Debemos de realizar estudios adicionales en caso de que el fenotipo no correlacione con el genotipo identificado, en especial atención a variantes de fenotipo leve como son p.Pro31Leu y p.Val282Leu que junto con otras variantes en *cis* dan lugar a fenotipo severo (microconversión del promotor o variantes intrónicas). También hay que recordar que la variante severa p.Gln319* en la mayoría de los casos coexiste con una duplicación génica funcional del gen, por lo que es necesario evaluar el número de copias.
- Está indicado el asesoramiento genético en portadores y afectos de variantes severas. Las variantes severas en heterocigosis compuesta con variante leve dan lugar a la forma no clásica o tardía de la enfermedad, mientras que la presencia de dos variantes severas da lugar a un fenotipo clásico o severo.
- Dulín Iñiguez E, Ezquieta Zubicaray B. Cribado neonatal de hiperplasia suprarrenal congénita. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2018;65(1):1-4.
- Ezquieta Zubicaray B. Hiperplasia suprarrenal congénita. Forma con pérdida salina y diagnóstico previo de pseudohipoadosteronismo. *Ed Cont Lab Clín.* 2013-2014;18:75-94.
- Hannah-Shmouni F, Chen W, Merke DP. Genetics of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2017;46:435-458.
- Herrera-Gómez A. Hiperplasia suprarrenal congénita: origen de trastornos del desarrollo y diferenciación sexual. *Med Uis.* 2015;28:125-132.
- Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T, et al. Effects of individual mutations in the P450(c21) pseudogen on the P450(c21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biochem.* 1991;109:638-44.
- Kleinle S, Lang R, Fischer GF, Vierhapper H, Waldhauser F, Födinger M, et al. Duplications of the Functional CYP21A2 Gene Are Primarily Restricted to Q318X Alleles: Evidence for a Founder Effect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:3954-8.
- Krone N, Braun A, Weinert S, Peter M, Roscher AA, Partsch CJ, et al. Multiplex minisequencing of the 21-hydroxylase gene as a rapid strategy to confirm congenital adrenal hyperplasia. *Clin Chem.* 2002; 48:818-25.
- Narasimhan ML, Khattab A. Genetics of congenital adrenal hyperplasia and genotype-phenotype correlation. *Fertil Steril.* 2019;111:24-29.
- Nimkarn S, Gangishetti PK, Yau M, New MI. 21-Hydroxylase-Deficient Congenital Adrenal Hyperplasia. 2002 Feb 26 [Updated 2016 Feb 4]. In: Adam MP, ed. *GeneReviews*. Seattle, WA: University of Washington; 1993-2021. P. 1-27. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1171/>
- Pignatelli D, Carvalho BL, Palmeiro A, Barros A, Guerreiro SG, Macut D. The Complexities in Genotyping of Congenital Adrenal Hyperplasia: 21-Hydroxylase Deficiency. *Front Endocrinol.* 2019;10:432.
- Rodríguez A, Ezquieta B, Labarta JI, Clemente M, Espino R, Rodríguez A, et al. Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de pacientes con formas clásicas de hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa. *An Pediatr.* 2017;87:116.e1-116.e10.
- Sanz Fernández M. Aspectos clínicos, bioquímicos y genéticos de pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21 hidroxilasa detectados mediante programa de cribado neonatal de la Comunidad Autónoma de Madrid [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense; 2019
- Sweeten TL, Odell DW, Odell JD, Torres AR. C4B null alleles are not associated with genetic polymorphisms in

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Concolino P, Mello E, Toscano V, Ameglio F, Zuppi C, Capoluongo E. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for the detection of *CYP21A2* gene deletions/duplications in Congenital Adrenal Hyperplasia: First technical report. *Clin Chim Acta.* 2009;402(1-2):164-70.

the adjacent gene CYP21A2 in autism. *BMC Med Genet.* 2008;9:1.

- Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dumic M, New MI, White PC. A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol.* ;1991;5:685-92
- Xu Z, Chen W, Merke DP, McDonnell NB. Comprehensive Mutation Analysis of the CYP21A2 Gene. An Efficient Multistep Approach to the Molecular Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Mol Diagn.* 2013;15(6):745-53.

ENTENDIENDO LAS LIMITACIONES DE LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR. PCR DIGITAL: A PROPÓSITO DE UN CASO

Autores: Ana Arteché-López¹, Laura Rausell Sánchez², María Teresa Sanchez Calvin¹

¹ Servicio de Genética. Hospital Universitario 12 de Octubre

² Instituto de Medicina Genómica (IMEGEN)

Palabras clave: PCR digital, Titinopatías, Exoma

EXPOSICIÓN DEL CASO

Mujer de 10 años en seguimiento por sospecha de miopatía congénita. Pies zambos congénitos intervenidos. A los 11 meses destaca facies miopática, tetraparesia leve proximal de predominio escapular e hiporreflexia osteotendinosa generalizada. Ductus arterioso persistente con leve repercusión hemodinámica y una función miocárdica normal. Inicio de la marcha a los 18 meses; se levanta con maniobra de Gowers. Buen desarrollo del lenguaje.

Antecedentes familiares: Padres no consanguíneos, procedentes de Madrid. Hermana de 18 años con sospecha de miopatía congénita multi-minicore sin confirmación molecular tras el estudio de un panel de genes (N=238) relacionados con miopatías congénitas, en el que destaca la presencia en heterocigosis de la variante de significado clínico incierto (VSCI) c.18748T>C (p.Ser6250Pro) en el gen *TTN* (NM_133378.4).

Ante la alta sospecha de que se tratara de una enfermedad genética, se solicita un nuevo estudio de exoma dirigido al estudio miopatías al servicio de Genética del hospital 12 de Octubre.

TITINA. CONCEPTOS BÁSICOS

El gen *TTN* (*188840) con 364 exones, se localiza en 2q13.2 y codifica para la titina, la proteína humana de mayor tamaño (4200kDa). La titina es una proteína importante en la contracción muscular que se extiende desde el disco Z hasta la banda M dentro del sarcómero (ver anexo 1). Está compuesta por múltiples dominios repetidos de tipo inmunoglobulina (Ig) y fibronectina tipo 3 (FN3) intercalados por regiones de secuencia única, una región repetitiva PEVK y un dominio serina treonina quinasa (TK) (ver anexo 1). Debido a un *splicing* alternativo, se conocen las siguientes isoformas: i) N2A (expresión mayoritariamente esquelética con 312 exones); ii) N2BA (expresión mayoritariamente cardíaca con 313 exones) y iii) N2B, Novex-1, Novex-2, Novex-3: cuatro isoformas de expresión cardíaca de menor tamaño. Asimismo, cabe destacar la isoforma teórica inferida que incluye todos los exones salvo el 48 (363 exones) y que se corresponde al transcrito NM_001267550.1, sobre el cual se recomienda referenciar las variantes en *TTN* (ver anexo

1). Toda esta gran complejidad de la proteína y de sus distintas isoformas dificulta mucho la interpretación de las variantes en el gen *TTN*. Por ello, es especialmente

importante realizar un análisis cauteloso de las mismas, siempre dirigido por el fenotipo y sospecha clínica del paciente.

Las variantes patógenas en *TTN* se asocian a un amplio grupo de trastornos musculares y cardíacos con distintos patrones de herencia: miocardiopatía dilatada (#604145), miocardiopatía hipertrófica (#613765), miopatía miofibrilar con insuficiencia respiratoria temprana (#603689) y distrofia muscular tibial (#600334) con herencia autosómica dominante y miopatía de aparición temprana con miocardiopatía (#611705) y distrofia muscular de cinturas, ambas con herencia autosómica recesiva (#608807).

En concreto, las miopatías relacionadas con *TTN* constituyen un grupo muy heterogéneo de trastornos musculares con gran variabilidad en cuanto al modo de herencia (dominante versus recesivo), edad de aparición, patrón de afectación muscular, gravedad y progresión. Tanto es así que para unificar los pacientes con miopatía congénita y/o de aparición durante la infancia causados por variantes patogénicas en *TTN*, se ha sugerido el término “titinopatía congénita” (Oates et al. 2018), habiéndose descrito recientemente una correlación genotipo-fenotipo en relación a la localización de las variantes sin sentido y la severidad de la enfermedad (Savarese et al. 2020).

RESOLUCIÓN DEL CASO

En el exoma realizado se analizan aquellas variantes en genes relacionados con miopatías (N=38) que tras el análisis bioinformático (pipeline propio –*Karma*–) cumplen los criterios establecidos de calidad y frecuencia. Tras su visualización y análisis, destaca la presencia en heterocigosis de las variantes en el gen *TTN* que se detallan y visualizan en la tabla 1 y figura 1, respectivamente.

Gen	HGVSc/HGVSp	FILTRO	Alineador /Genotipador	Prof. lectura	Frec.var (cigoidad)
TTN (NM_001267550.2)	c.22480T>C (p.Ser7494Pro)	PASS	BWA BOWTIE /GATK VarDict	77x	42.9 (het)
TTN (NM_001267550.2)	c.1038_1039insAGT AAGGCAAA (p.Gln347Serfs*17)	PASS	BWA /GATK	94x	33.3 (het)
	c.1041del (p.Gly348Argfs*12)	PASS	BWA /VarDict	99x	19.7 (het)

Tabla 1. Detalle de las variantes detectadas en el gen de la *TTN* mediante el estudio de exoma dirigido. Prof. Lectura=profundidad de lectura; Frec. Var= frecuencia alélica; het=heterocigoto; IGV=Integrative Genomic Viewer

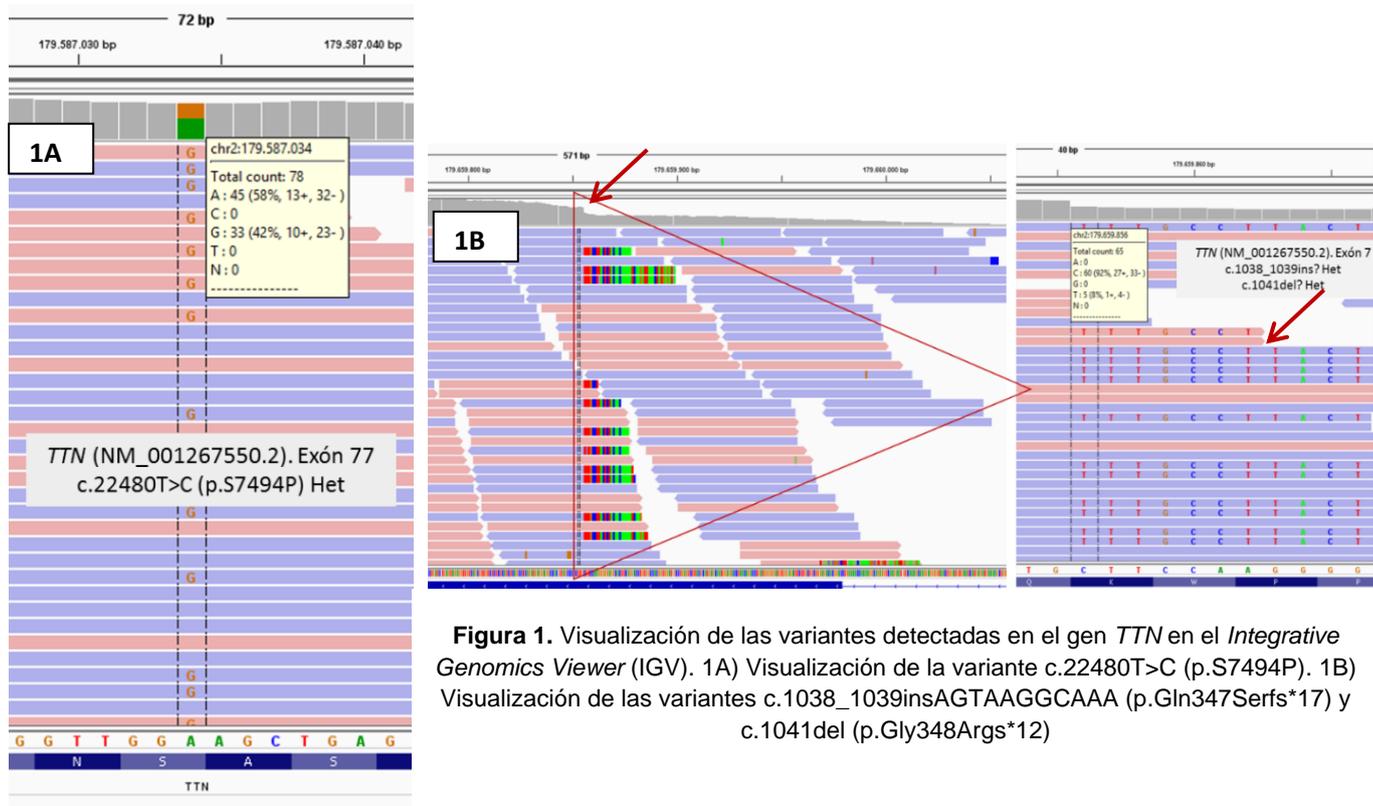


Figura 1. Visualización de las variantes detectadas en el gen *TTN* en el Integrative Genomics Viewer (IGV). 1A) Visualización de la variante c.22480T>C (p.S7494P). 1B) Visualización de las variantes c.1038_1039insAGTAAGGCAAA (p.Gln347Serfs*17) y c.1041del (p.Gly348Argfs*12)

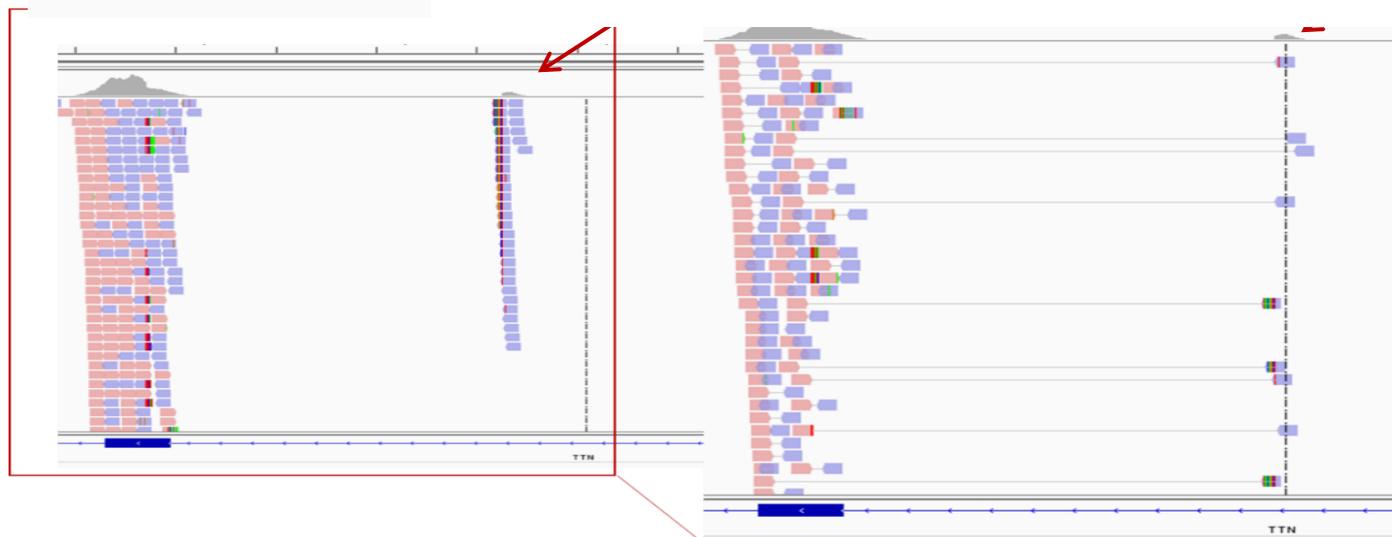


Figura 2: Visualización en el IGV de una delección en heterocigosis que incluye aproximadamente la mitad del intrón 6 y parte del exón 7 del gen *TTN* en el *probandus*. Elaboración propia

Destaca que:

- La variante c.22480T>C (p.Ser7494Pro) en el gen *TTN* detectada en la paciente según el transcrito NM_001267550.2 (isoforma inferida) corresponde a la variante c.18748T>C (p.Ser6250Pro) según el transcrito NM_133378.4 (isoforma N2A), previamente detectada en su hermana afecta.
- Las variantes c.1038_1039insAGTAAGGCAAA (p.Gln347Serfs*17) y c.1041del (p.Gly348Argfs*12) en el exón 7, previamente no identificadas en su hermana afecta, se detectan únicamente con el alineador BWA y cada una de ellas con tan solo el genotipador GATK y VarDict respectivamente (ver tabla 1).
- La visualización de estas alteraciones en IGV sugiere una posible delección de aproximadamente los primeros 40 aminoácidos del exón 7 del gen *TTN*, tal y como se observa con la bajada de cobertura y los cambios detectados en dicha región (flechas rojas; figura 1B).

El fenotipo de nuestra paciente y su hermana es compatible con una titinopatía autosómica recesiva, por lo que la VSCI c.22480T>C (p.Ser7494Pro) detectada en ambas hermanas junto con la posible delección del exón 7 del gen *TTN* únicamente detectada en nuestra paciente, podría ser compatible con el diagnóstico clínico de sospecha, de confirmarse su presencia en heterocigosis compuesta en ambas hermanas. Con el fin de confirmar la posible delección en nuestra paciente, se lleva a cabo una secuenciación Sanger del exón 7 del gen *TTN*, sin que se detecte ninguna variante patogénica en la secuencia analizada. Ante la sorpresa de este resultado, se analiza de nuevo y con más detalle la imagen en el IGV (figura 2).

En esta ocasión se observa que la posible delección en heterocigosis podría tratarse de una variante en el número de copia (CNV) en heterocigosis que no sólo afecta a parte del exón 7 sino también aproximadamente a la mitad del intrón 6, tal y como se evidencia por la presencia de secuencias capturadas de la paciente que alinean en dicha región (flecha roja en figura 2). Según el HGVS (*Human Genome Variation Society*; (<https://varnomen.hgvs.org/>), se trataría de la delección c.(914+1_915-1)_1037del, y por tanto, explicaría el resultado sin hallazgos de la secuenciación Sanger: los *primers* de la PCR realizada hibridaban en la región delecionada y por tanto, únicamente se estaba amplificando y detectando el alelo nativo (normal).

Paralelamente, se solicita el archivo FASTQ de la hermana confirmando que también presenta ambas variantes en heterocigosis, la variante c.22480T>C (p.Ser7494Pro) y la delección c.(914+1_915-1)_1037del en el gen *TTN* (figura 3), pendiente de confirmación (figura 3).

Dado el tamaño, la localización de la CNV y la ausencia de sondas en dicha región, no es posible su confirmación mediante CGH-array. Tampoco es posible su estudio mediante MLPA (*Multiplex-Ligation-dependent Probe Amplification*). Por tanto, es necesario recurrir a la técnica de la PCR Digital (dPCR) que, gracias a su fácil diseño, es muy útil para la detección de este tipo de CNVs.

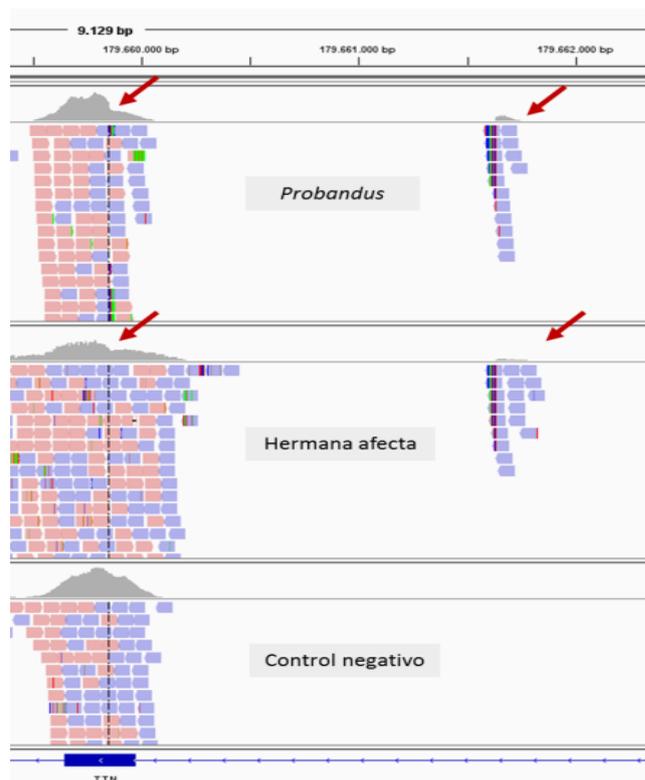


Figura 3. Imagen comparativa de la delección c.(914+1_915-1)_1037del en el *probandus*, su hermana afecta y un control negativo. Elaboración propia

Se diseñaron los *primers* específicos flanqueantes a la región de interés y una sonda marcada con el fluoróforo FAM localizada entre exón 7 e intrón 6 (figura 4). Con el fin de posteriormente normalizar los datos, se diseñaron también *primers* específicos flanqueantes al exón 2 del gen *HBB* (gen de expresión ubicua localizado en 11p15.4 (β -globina; *141900)), y una sonda específica de dicha región marcada con el fluoróforo VIC.

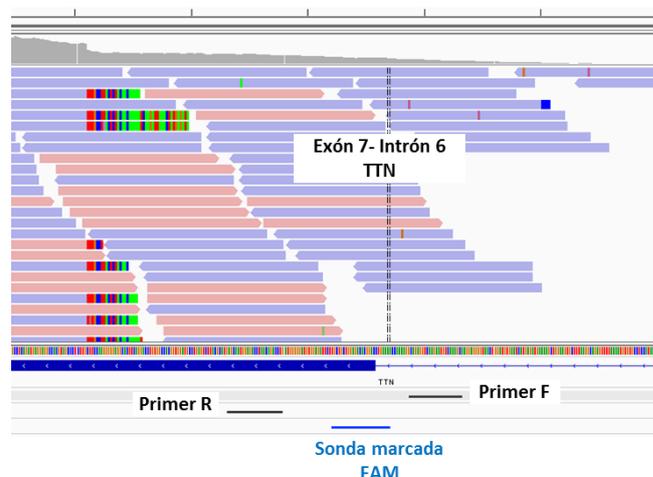


Figura 4: Diseño de los *primers* y la sonda marcada en FAM para el estudio de confirmación de la CNV mediante PCR digital. Elaboración propia

MUESTRAS	RESULTADO OBTENIDO			
	CHIP	COPIAS/ μ l VIC (β -globina)	COPIAS/ μ l FAM (exón 7 <i>TTN</i>)	PORCENTAJE
Probandus	D05OGJ	1082,7	585,5	54* *Delección heterocigosis
Hermana de probandus	D05P9F	296,18	145,43	49* *Delección heterocigosis
WT	D05ORC	1013,3	982,95	97

Tabla 2: Resultados de la dPCR. Datos obtenidos y proporcionados por IMEGEN (Instituto de Medicina Genómica)

Como comentaremos más adelante, tras la partición de la muestra y la cuantificación absoluta de cada una de las señales durante la dPCR, éstas se normalizan y comparan. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos: las señales de FAM (CNV en estudio) con respecto a las señales VIC (β -globina) son, aproximadamente, la mitad en la paciente (585,5 vs 1082) y en su hermana (145,43 vs 296,18). En la muestra control, sin embargo, las señales FAM y VIC son similares (982,95 vs 1013,3). Estos resultados confirman la presencia de la delección en heterocigosis en ambas hermanas. Los resultados de la dPCR de la paciente se muestran en la figura 5.

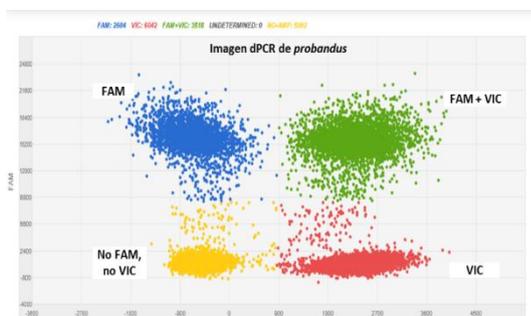


Figura 5. Imagen de los resultados de la dPCR en la paciente. Elaboración propia

Por tanto, nuestra paciente y su hermana, ambas con sospecha de miopatía congénita, son heterocigotas para las variantes c.22480T>C (pS7494P) y la delección c.(914+1_915-1)_1037del en el gen *TTN*:

- La variante c.22480T>C (pS7494P) en el gen *TTN*, es una transición de una T por una C (c.18748T>C) que a nivel de la proteína produce, presumiblemente, el cambio de la Serina de la posición 6250 por una Prolina (p.S6250P). Este cambio no ha sido descrito previamente en la literatura ni en las bases de datos consultadas (-*gnomAD*-). Se localiza en banda I, en el dominio "Ig-like 53" de la proteína y 5 de los 12 programas de

predicción *in silico* utilizados, predice un efecto patogénico para la variante.

- La delección c.(914+1_915-1)_1037del en el gen *TTN*, comprende desde aproximadamente la posición 1655 del intrón 6 hasta la posición 1037 del exón 7 del gen. Se trata de una variante localizada en banda Z, que no se encuentra publicada en las bases de datos poblacionales consultadas y, hasta nuestro conocimiento, tampoco se ha reportado en la literatura científica en pacientes afectados. Sin embargo, sí se ha descrito la presencia de variantes de pérdida de función en el gen *TTN* como un mecanismo de patogénicidad.

En base a la evidencia científica actual y teniendo en cuenta el fenotipo de las hermanas, se consideran ambas variantes probablemente patogénicas según los criterios ACMG (Richards et al. 2015). A falta del estudio de segregación en los padres que nos permitirá confirmar que se tratan de variantes en heterocigosis compuesta y reclasificar las

variantes a patogénicas, estos resultados son compatibles con el diagnóstico de titinopatía congénita autosómica recesiva en ambas hermanas.

CONCEPTOS BÁSICOS DE LA PCR DIGITAL

La PCR digital (dPCR) fue desarrollada con el fin de detectar muy pequeñas cantidades de ácidos nucleicos y/o variantes genéticas con frecuencias alélicas muy bajas, pero actualmente tiene múltiples aplicaciones en el campo de la Biomedicina: i) detección de variantes de número de copias, ii) identificación microbiológica y cuantificación de bacterias y virus, iii) análisis de expresión de microRNA o iii) estudio del ADN fetal circulante en sangre materna para la detección de sexo fetal, Rh fetal, enfermedades monogénicas en sangre materna, entre otras.

Se trata de una técnica muy sensible que combina la sencillez de la PCR tradicional con la capacidad de cuantificación de la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). A diferencia de ésta, permite una cuantificación absoluta de la molécula de ADN diana sin necesidad de estándares de

calibración, lo que la convierte en un proceso sencillo, rápido y preciso. Además, es menos dependiente de factores externos que puedan afectar a la eficiencia de la PCR y su diseño es sencillo convirtiéndola asimismo en una técnica reproducible.

Su principio básico consiste en una dilución y división limitante de la muestra en millones de unidades que, idealmente, contiene una o ninguna molécula de ADN diana. Cada una de estas unidades constituye un microreactor individual con todos los reactivos necesarios, incluyendo sondas específicas marcadas, para llevar a cabo la reacción de PCR: si contiene una o ninguna molécula, se producirá una señal positiva (1) o negativa (0), respectivamente. Se trata de una cuantificación binaria (de ahí el término “digital”) que depende de la distribución aleatoria de moléculas en muchas particiones la cual sigue una distribución de Poisson. Conociendo el volumen de reacción en cada una de las unidades, y el número total de unidades de partición, es posible determinar la concentración absoluta de la molécula diana. A mayor número de particiones, mayor será la precisión del ensayo.

En la figura 6 se muestran el principio básico y las distintas fases de la técnica dPCR: a) Preparación de la muestra, b) Partición; c) Amplificación y d) Detección.

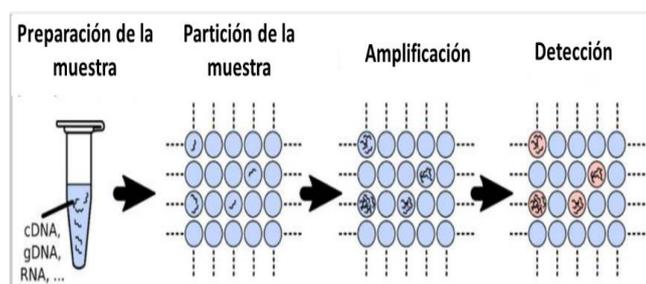


Figura 6. Principios de la PCR digital: La muestra se divide en muchas particiones independientes, de modo que cada una contiene ninguna o unas pocas moléculas diana que se detectan por fluorescencia tras la amplificación. La relación de particiones positivas (presencia de fluorescencia) sobre el número total permite determinar la concentración de la molécula diana en la muestra. Obtenido de Quan, Sauzade, and Brouzes, 2018

Tradicionalmente, la dPCR requería la realización previa de diluciones seriadas. Actualmente, gracias a los avances tecnológicos, la partición de la muestra puede realizarse de manera automática limitando el uso de reactivos. Existen dos modalidades de partición: i) partición basada en la química de la emulsión y ii) partición basada en un sistema de microfluídico. El primero se trata de un sistema que crea emulsiones de gotitas en un medio oleoso (*droplet*-digital PCR ddPCR) mientras que el segundo se trata de un sistema microcanal físico (de superficie o capilar) diseñado en placas o matrices donde se produce la partición de la muestra (más información en (Quan, Sauzade, and Brouzes 2018).

De entre sus múltiples aplicaciones en el campo de la Biomedicina, tal y como se ha descrito en el caso expuesto,

destaca la posibilidad de detectar CNVs que no podrían analizarse mediante otros métodos alternativos tales como array-CGH o MLPA por falta de disponibilidad. El diseño de una dPCR es sencillo y accesible, lo que permite y facilita el estudio de estas regiones del genoma, mejorando en último término nuestra capacidad diagnóstica.

ASPECTOS IMPORTANTES APRENDIDOS DURANTE LA EXPOSICIÓN DEL CASO:

1. No existe una técnica molecular universal que nos permita detectar todo tipo de alteraciones. Cada técnica tiene sus limitaciones y es vital entender y analizar cada una de ellas en detalle para su buen uso y para una correcta interpretación de las mismas.
2. Cuando nos referimos a una variante genética es muy importante indicar siempre el transcrito al que hace referencia. Esta es la única manera de poder estandarizar y asegurarnos de que el estudio y su interpretación es el adecuado.
3. Para mejorar el rendimiento diagnóstico mediante NGS, es fundamental disponer de un muy buen análisis bioinformático que siga todas las recomendaciones establecidas (Roy et al. 2018). El uso de pipelines que utilicen al menos dos alineadores y dos genotipadores, como se muestra en este ejemplo, es de gran importancia.
4. El gen *TTN* (*188840; 2q13.2) codifica para la titina, la proteína humana conocida de mayor tamaño. Su estructura es compleja y existen distintas isoformas con expresión cardíaca y/o esquelética. Las variantes patogénicas en este gen se han asociado a diversos trastornos cardíacos y musculares, siendo estos últimos muy heterogéneos y con gran variabilidad fenotípica. La interpretación de las variantes en *TTN* debe realizarse de manera cautelosa, siempre considerando el fenotipo del paciente.
5. La PCR digital (dPCR) se trata de una técnica novedosa, reproducible y muy sensible que, a diferencia de la qPCR, permite una cuantificación absoluta de los ácidos nucleicos sin la necesidad de calibradores ni estándares internos. Gracias a que su diseño es sencillo, se trata de una técnica muy útil para la detección de CNVs así como para la detección de variantes con muy baja frecuencia alélica, entre otras muchas aplicaciones en el campo de la Biomedicina (oncología, microbiología, diagnóstico prenatal etc)
6. El diagnóstico de las enfermedades raras es complejo y, en general, supone un número elevado de pruebas y sucesivas consultas, lo cual se traduce en largos años de espera hasta la obtención de un diagnóstico molecular concluyente (10 y 19 años en nuestro caso). El trabajo multidisciplinar y en equipo es vital para reducir estos tiempos y mejorar el diagnóstico de los pacientes.

ANEXO 1

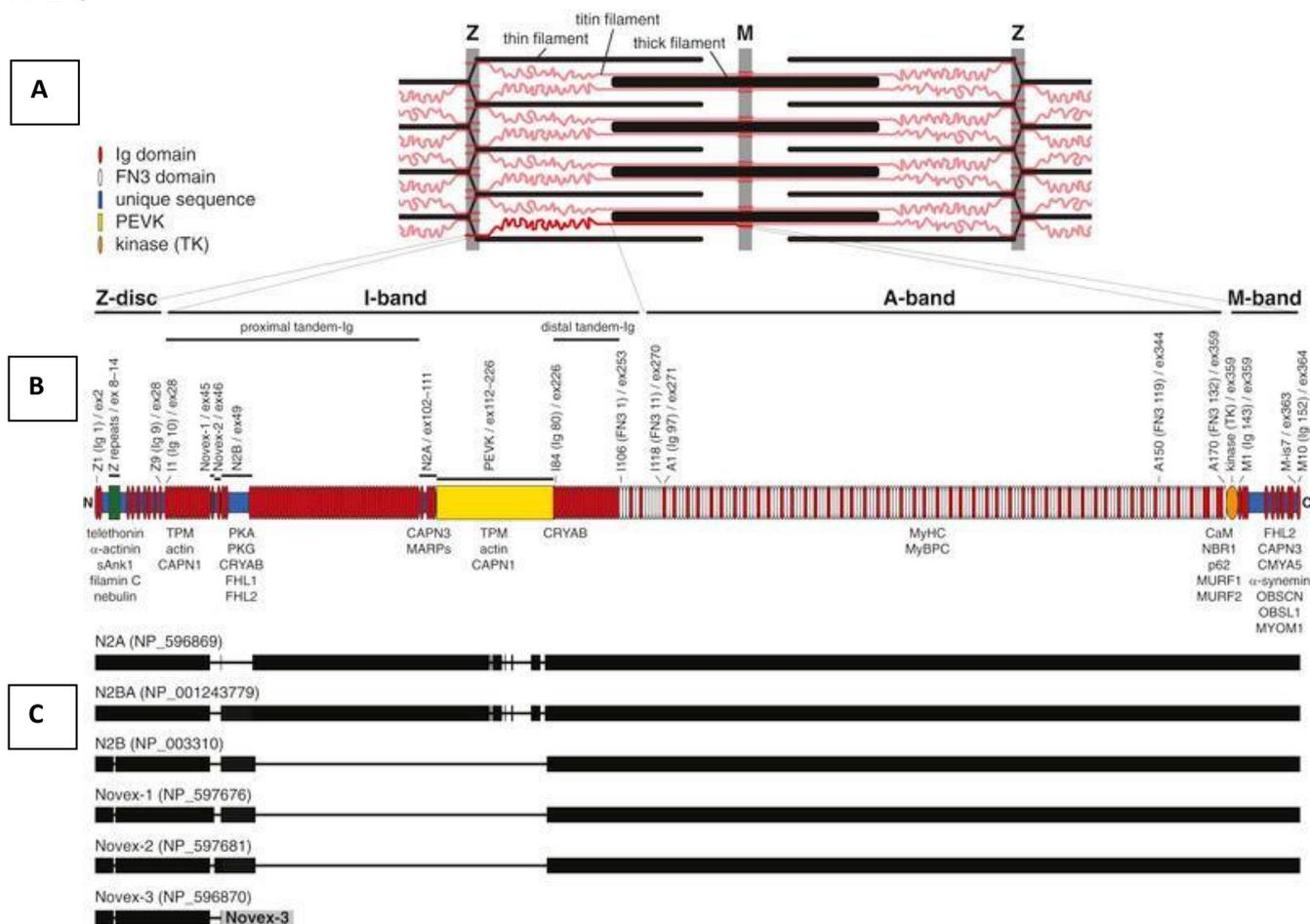


Figura 1. Estructura molecular de la titina. Obtenida de Savarese *et al*, 2016

- A) Vista esquemática del sarcómero, con filamentos de titina en rojo. La molécula de titina se extiende desde el disco Z hasta la banda M.
- B) Estructura modular de la proteína titina (isoforma *inferida*). Se compone de cuatro partes principales (disco Z, banda I, banda A y banda M) y de dominios repetidos de tipo inmunoglobulina (Ig) y fibronectina tipo 3 (FN3), intercalados por regiones de secuencia única. También contiene la región repetitiva PEVK en la banda I, y un dominio serina treonina quinasa (TK) en la M-banda. Se compone principalmente de dominios similares a inmunoglobulina (Ig; rojo) y similares a fibronectina tipo 3 (FN3; blanco) repetidos. Las interacciones proteicas de las diferentes partes de la titina se resumen debajo del diagrama.
- C) Principales de isoformas de la titina (NCBI RefSeq)

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Kanagal-Shamanna R. Digital PCR: Principles and Applications. *Methods in Molecular Biology*. 2016; 1392:43–50. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0_5.
- Oates EC, Jones KJ, Donkervoort S, Charlton A, Brammah S, Smith JE 3rd, et al. Congenital Titinopathy: Comprehensive Characterization and Pathogenic Insights. *Ann Neurol*. 2018;83(6):1105–24. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ana.25241>.
- Quan PL, Sauzade M, Brouzes B. dPCR: A Technology Review. *Sensors*. 2018;18(4):1271. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/s18041271>.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17 (5):405–23. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- Roy S, Coldren C, Karunamurthy A, Kip NS, Klee EW, Lincoln SE, et al. Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2018 Jan;20(1):4-27. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.11.003>
- Savarese M, Sarparanta J, Vihola A, Udd B, Hackman P. Increasing Role of Titin Mutations in Neuromuscular

Disorders. *J Neuromuscul Dis.* 2016;3(3):293-308.
Disponibile en: <https://doi.org/10.3233/JND-160158>.

- Savarese M, Vihola A, Oates EC, Barresi R, Fiorillo C, Tasca G, Jokela M, et al. Genotype–Phenotype Correlations in Recessive Titinopathies. *Genet Med.* 2020;22(12):2029-40. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0914-2>.

BIOPSIA LÍQUIDA

Autores: Ylenia Pérez Arnaiz, Beatriz Hidalgo Calero

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Biopsia líquida, ADN tumoral circulante, Células tumorales circulantes

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las causas predominantes de muerte en el mundo¹ aunque en la última década se observa una tendencia negativa en esta mortalidad gracias al desarrollo de nuevas técnicas que permiten el diagnóstico precoz, la monitorización de la enfermedad y, en consecuencia, la administración de un tratamiento adecuado².

Hasta ahora, uno de los métodos de elección en el diagnóstico tumoral es la conocida biopsia donde se extraen y analizan células o tejidos, tumoral o probablemente tumoral, para determinar la patogenicidad de este. Este procedimiento, en algunos casos, es enormemente invasivo y conlleva riesgos asociados a la intervención quirúrgica. Además, puesto que tumores primarios y zonas metastásicas desarrollan diferencias genómicas en relación con el material genético normal del individuo y en ocasiones, diferencias genómicas entre ellos, realizar biopsias convencionales puede no resultar representativo del estado del tumor³. Estos inconvenientes son los que han promovido la investigación y el desarrollo de nuevas técnicas o estudio de biomarcadores cuyos riesgos para con el paciente sean considerablemente menores y cuyos resultados aporten gran información acerca del estadio del tumor, la localización y el tratamiento más adecuado de este.

Un biomarcador es “una característica o cambio fisiológico, bioquímico o morfológico medible y evaluable a nivel molecular, bioquímico o celular que actúa como indicador de un proceso biológico normal o patológico, o como respuesta a una intervención terapéutica”⁴. La definición de biomarcador la podemos extrapolar al ámbito oncológico, donde se encuentran los marcadores tumorales. Estos marcadores incluyen una amplia variedad de moléculas “producidas o inducidas por la célula neoplásica, que reflejan su crecimiento y/o actividad y que permiten conocer la presencia, la evolución o la respuesta terapéutica de un tumor maligno”. La mayoría de estos marcadores tumorales no son específicos de las células neoplásicas ya que también aparecen en bajos niveles en ausencia de tumor o en altas concentraciones ante diversas patologías benignas, por ejemplo, la alfa feto proteína (AFP) es indicativa, en concentraciones muy altas, de tumores hepáticos, ováricos o testiculares; aunque puede verse elevada en enfermedades hepatobiliares o la beta gonadotropina coriónica humana (β -hCG) indicativa de tumores testiculares y ováricos pero muy elevada en mujeres gestantes⁵.

La revolución en el campo de los biomarcadores ha llegado con la biopsia líquida (también conocida como “test de ADN tumoral circulante o test de biomarcadores basados en la sangre”⁶) es una técnica de diagnóstico no invasiva donde se analizan biomarcadores circulantes en líquidos biológicos, mayoritariamente sangre, aunque también se puede analizar

orina o líquido cefalorraquídeo, entre otros⁷. En este caso, se ha descubierto la liberación al torrente sanguíneo, no solo de moléculas, sino también de estructuras celulares y componentes macromoleculares. Entre estos biomarcadores destacan las células tumorales circulantes (CTCs) y ADN tumoral circulante (ADNtc), procedentes tanto del tumor primario como de las distintas zonas metastásicas³. Una de las grandes ventajas es que estos biomarcadores son específicos del tumor, a diferencia de otros marcadores tumorales, como los previamente mencionados. Además, la muestra, al tratarse generalmente de sangre periférica, es de fácil acceso, lo que permite la extracción repetida del espécimen y, por tanto, favorece el seguimiento del tumor y la monitorización del tratamiento³.

ADN TUMORAL CIRCULANTE

El ADN tumoral circulante es lo que se conoce como el ADN libre circulante específico de tumor (de doble cadena o de cadena sencilla), que puede aparecer en plasma⁸, plaquetas, exosomas o en la capa leucocitaria^{9,10}. Alberga las mutaciones presentes en el tumor original y gracias a que estas aparecen en células pretumorales y su genoma puede ser ya vertido al torrente sanguíneo, nos va a permitir detectar el cáncer en estadios muy tempranos de la enfermedad¹¹. Normalmente se buscan mutaciones puntuales en genes concretos que son característicos del tipo de tumor, como por ejemplo *KRAS*, *P53* y *CDKN2A* en adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC), aunque en otros casos, es conveniente el estudio de paneles más amplios puesto que pueden verse afectados otros genes, aunque aparezcan con menos frecuencia en la población¹².

- **Estudio de ADN tumoral circulante**

Para el estudio de ADNtc se ha de tener en cuenta que su variabilidad tanto intra como interindividual es muy elevada (entre el 0,01% y el 93% del ADN libre circulante puede derivar de tumor) por lo que se precisan equipos muy sensibles y específicos para detectar las bajas tasas de mutación¹³. Las nuevas técnicas de secuenciación masiva (NGS), o distintas variantes de la PCR, como la PCR digital (dPCR), han permitido la detección de mutaciones ligadas al tumor, aunque su proporción sea minoritaria¹².

A pesar de que las técnicas de secuenciación de nueva generación poseen una tasa de detección alta, no es tan alta como las técnicas basadas en la PCR. Los equipos de NGS poseen una sensibilidad de 1-5% mientras que las técnicas basadas en PCR, permiten la detección de mutaciones que se encuentran en una proporción de hasta el 0.01%. Por ello, estas últimas son más adecuadas para el estudio de cambios en mutaciones conocidas^{12,14} tras la administración del tratamiento mientras que las técnicas de NGS son más adecuadas para el descubrimiento de mutaciones nuevas¹¹,

utilizándose estas técnicas NGS para el diagnóstico tumoral y las técnicas basadas en la PCR para el seguimiento del mismo.

CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

Las células tumorales circulantes son células tumorales epiteliales, cuyo tamaño ronda entre 4 y 30 μm^{15} , que aparecen en sangre periférica tras ser liberadas por el tumor⁹. Suelen aparecer en un estadio tumoral temprano, siendo esto una de las grandes ventajas del estudio de este biomarcador. Hay que tener en cuenta que estas CTCs no solo proceden del tumor primario, sino que también pueden proceder de las diferentes recidivas y zonas metastásicas, por lo que sus características genéticas pueden variar entre sí y, así, aportan información única del tumor y su metástasis¹⁶.

Estas células expresan marcadores epiteliales, aunque algunas pueden experimentar una transición epitelio-mesenquimal¹⁷ desdiferenciándose y adquiriendo propiedades mesenquimales propias de células madre, como resistencia a la apoptosis o aumento de la movilidad e invasividad. Este proceso es crucial en el desarrollo de un tumor¹⁸ y es el que le proporciona la agresividad característica¹⁵. Por lo tanto, la expresión o no de marcadores epiteliales, como EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales) o citoqueratina, y la diferencia en cuanto al tamaño entre células normales y tumorales, permiten el aislamiento y estudio de las CTCs por técnicas basadas en propiedades morfológicas¹⁹.

Una de las desventajas del estudio de CTCs es que la cantidad de estas vertidas al torrente sanguíneo por parte del tumor suele ser baja (1 CTC de cada 10⁹ células sanguíneas en pacientes con metástasis) y, además, la concentración suele variar según el tipo de tumor¹⁹, por lo que pueden ser difíciles de estudiar y es necesario un cuidadoso aislamiento y enriquecimiento. Sin embargo, encontramos variaciones intraindividuales ya que en un mismo paciente la cantidad de CTCs varía a lo largo del tiempo en relación a la eficacia del tratamiento que se le ha administrado o realizado (como quimioterapia o cirugía), siendo la detección de CTCs un buen biomarcador de seguimiento y pronóstico de la enfermedad⁹. Además, el estudio de CTCs permite estudiar desde el genoma hasta el transcriptoma y proteoma de estas células al contener ARNm del tumor y proteínas¹⁹.

- Estudio de células tumorales circulantes

En primer lugar, es necesario aislar estas CTCs para luego estudiar su genoma. Para ello, hay que tener en cuenta diferentes parámetros que deben ser óptimos como especificidad, sensibilidad, pureza, viabilidad y rendimiento⁹. Además, este aislamiento resulta dificultoso debido a que la presencia de estas células en sangre es muy baja^{19, 20} por lo que es necesario el uso de técnicas de alta selectividad y sensibilidad. Entre estas técnicas encontramos métodos de aislamiento microfluídicos que se benefician de las diferencias físicas (tamaño, densidad o características dieléctricas) y moleculares existentes entre las CTCs y las células sanguíneas. Por ejemplo, entre las técnicas que utilizan la diferencia de tamaño entre CTCs y las demás

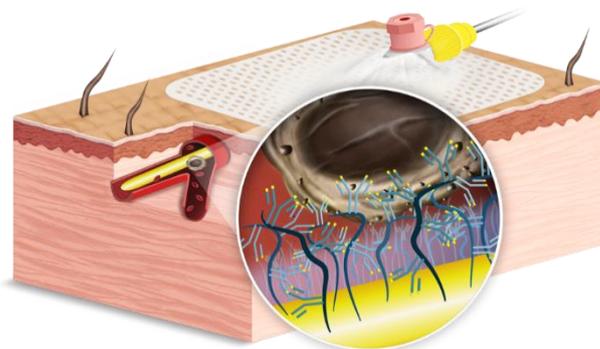


Figura 15. Nanodetector GILUPI CellCollector®. Tomado de: <https://gilupi.com>

células, encontramos el sistema ISET donde se consigue concentrar las CTCs al hacer pasar la muestra de sangre total por una membrana porosa con un tamaño de poro de 10 μm^{21} . Uno de los grandes inconvenientes de esta técnica es la heterogeneidad, en cuanto a tamaño se refiere, tanto de células sanguíneas como de CTCs²³. Esto impide la obtención de un concentrado puro ya que los leucocitos de mayor tamaño quedarán retenidos en la membrana y las CTCs de menor tamaño pasarán a través de ella, perdiendo células que pueden aportar gran información acerca del tumor. Para solventar este inconveniente, se va a aumentar el tamaño celular al añadir a la muestra “microbolitas” cubiertas de anticuerpos anti-EpCAM que reconocerán a las CTCs que posean esta molécula expresada en su superficie¹⁵.

Por otro lado, para lidiar con el principal problema en el estudio de CTCs, la baja concentración de estas en sangre, se ha desarrollado un nanodetector (GILUPI CellCollector®) Figura 1 que permite extraer las CTCs directamente *in vivo*. Se trata de un dispositivo recolector en forma de aguja que presenta un nanodetector con anticuerpos anti-EpCAM unidos. Este dispositivo se introduce en una de las venas del brazo por donde pasará, durante 30 min, aproximadamente un litro y medio de sangre. De esta forma, no se obtendrán las CTCs que hay en sangre tras una extracción aislada de unos 10 mL de sangre, sino que se obtendrán las CTCs contenidas en un mayor volumen de sangre sin necesidad de realizar una extracción sanguínea¹⁵.

APLICACIONES DE LA BIOPSIA LÍQUIDA

- Monitorización de la enfermedad

Los tumores vierten su contenido al torrente sanguíneo de forma continua. La cuantificación de estos biomarcadores, como el ADNtc, permite correlacionar la concentración de biomarcador en sangre con el estadio del tumor ya que, a mayor concentración, más avanzado es el estadio del tumor⁸. Además, se ha demostrado que los pacientes cuya concentración de ADNtc sanguíneo es menor, gozan de una probabilidad de supervivencia mayor que si los niveles de ADNtc fueran mayores²⁴. El estudio de ADNtc también se correlaciona con la probabilidad de recurrencia, especialmente en pacientes con cáncer gastroesofágico, de mama, colorrectal y pancreático⁸.

Además, gracias a la escasa invasividad de este procedimiento, se puede realizar tras las intervenciones quirúrgicas y la administración de tratamiento adyuvante, permitiendo detectar enfermedad mínima residual gracias al corto tiempo de vida media del ADNtc (aproximadamente unas 2 horas)^{13,14}.

- **Monitorización de resistencias**

La resistencia al tratamiento que presentan algunos tumores es uno de los mayores retos para superar la enfermedad. Estas resistencias aparecen como resultado de la selección y evolución clonal del tumor^{25,26}.

Gracias a la biopsia líquida es posible estudiar el ADNtc, u otros biomarcadores, tras la administración del tratamiento y así conocer cómo adquieren resistencia las células tumorales. Por ejemplo, en un estudio realizado por Murtaza M. y col.²⁵, en pacientes con cáncer de mama, ovario o pulmón avanzados, a los que se le tomó muestra antes de la administración del tratamiento y en diversos puntos durante la toma de este, se ha visto que, tras la administración de los fármacos, el genoma tumoral se modificó apareciendo distintas mutaciones en genes concretos.

Además, con el estudio del genoma tumoral no solo se pueden conocer las mutaciones derivadas de la administración de un fármaco, sino que es posible conocer las mutaciones que posee el tumor que derivarán en una resistencia a un fármaco concreto permitiendo llevar a cabo una terapia personalizada²⁷.

VENTAJAS DE LA BIOPSIA LÍQUIDA FRENTE A OTRAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Desde hace muchos años, la biopsia de tejido ha sido, por excelencia, la técnica de diagnóstico tumoral. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, en algunos pacientes, el tejido tumoral es de difícil obtención por la complejidad del procedimiento quirúrgico o porque el pequeño tamaño del tumor hace que sea difícil de alcanzar el tejido adecuado¹². Además, la heterogeneidad tumoral hace más complicado conseguir buenos resultados. Estos problemas se han solventado con la aparición de la biopsia líquida ya que, en principio, aporta la misma información genética que la biopsia de tejido²⁰, sin embargo, presenta ciertas ventajas. Entre ellas están:

- Facilidad de recolección de muestra y mínima invasividad. Al tratarse de una extracción de sangre periférica, se permite la obtención de forma reiterada facilitando un mejor seguimiento y monitorización de la enfermedad²⁸.
- Estudio del mosaico tumoral ya que en sangre aparecen biomarcadores de las distintas partes del tumor.
- Diagnóstico precoz al aparecer el ADNtc en el torrente sanguíneo antes de que el tumor sea visible mediante técnicas de imagen¹⁹.
- Detección de micrometástasis mediante el estudio de CTCs prácticamente imposibles de diagnosticar por imagen²⁸.

Sin embargo, a pesar de la alta especificidad del diagnóstico de mutaciones en ADNtc, no nos podemos olvidar de otros marcadores tumorales que, en combinación, nos van a aportar mayor sensibilidad y especificidad en la detección del cáncer. Por ejemplo, en el caso del adenocarcinoma ductal de páncreas, la combinación del marcador CA19.9 con el estudio de ADNtc mediante biopsia líquida, aumenta la sensibilidad y especificidad de detección tumoral. Por ello, el estudio de marcadores tumorales tradicionalmente conocidos y la biopsia líquida deben complementarse para obtener un mejor diagnóstico¹².

LIMITACIONES DE LA BIOPSIA LÍQUIDA

En cuanto a las limitaciones de la biopsia líquida, aparecen algunas de ellas inherentes a la naturaleza del biomarcador y otras derivadas del procedimiento preanalítico y analítico.

- Elevada variabilidad intra e interindividual de ADNtc por lo que este no se va a detectar en todos los pacientes con cáncer en estadios tempranos. En el estudio realizado por Pérez-Ramírez y col.²⁴ se demostró que en todos los pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas en estadio II, III o IV (avanzado) se encontraba ADNtc mientras que solo la mitad de los pacientes con cáncer en estadio I presentaban ADNtc. Esta desventaja se puede ampliar a los diferentes biomarcadores ya que es posible que no todos los tumores segreguen la cantidad necesaria de estos a la sangre para poder ser detectados, aislados y estudiados²⁹. Por ejemplo, se sabe que no se liberan CTCs a la sangre de forma continua ni regular y entre el 10 y el 50% de los casos de metástasis no son detectadas²³.
- En cuanto al aislamiento de CTCs mediante selección positiva con anticuerpos anti-EpCAM, cabe destacar que algunas CTCs no expresan este antígeno en superficie expresando en su lugar otros marcadores que no serán seleccionados, omitiendo, por tanto, otras subpoblaciones de CTCs³⁰.
- Falta de estandarización de la fase preanalítica necesaria para reducir la variabilidad.
- Es necesario definir métodos de cuantificación y de aislamiento de los distintos biomarcadores y mejorar la sensibilidad de los equipos de detección¹⁹.
- Técnicas de detección de ADNtc complejas limitando la reproducibilidad y siendo necesario tanto un personal especializado como buenas infraestructuras de almacenaje de datos incrementando el coste de la técnica.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. Organización Mundial de la Salud. Cáncer [Internet]. Ginebra: OMS; 2018 [citado 31 jul 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Estapé Rodríguez J. Visión de conjunto de la oncología médica. En: Rozman C, Farreras P Medicina interna. 17ª ed. Madrid: Elsevier; 2012. p. 1067-8
3. Alix-Panabières C, Pantel K. Real-time liquid biopsy: circulating tumor cells versus circulating tumor DNA. *Ann Transl Med.* 2013;1(2):18.
4. Illana Robles F. Jornada de compra pública innovadora. Proyecto Ingesa [Internet]. Madrid: INGESA; 2016 [consultado 31 jul 2020]. Disponible en: <https://ingesa.sanidad.gob.es/novedades/docs/Biomarcadores.pdf>
5. Molina R, Filella X, Trape J, Augé JM, Barco A, Cañizares F et al. Principales causas de los falsos positivos en los resultados de marcadores tumorales en suero. *Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comisión de Marcadores Biológicos del Cáncer.* [31 jul 2020]; Disponible en: <http://www.dep15.san.gva.es/cas/hospital/sesclin/Falso%20positivos%20en%20marcadores%20tumorales.pdf>
6. Senesciència. Biòpsia líquida. Senesciència [Internet]. 2015 [consultado 31 julio 2020];1(7):1. Disponible en: <http://www.ub.edu/senesciencia/noticia/biopsia-liquida/>
7. Beishon M. What can we learn from liquid biopsies? *Cancer World.* 2015;68(1):12-7.
8. Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget.* 2015;7(30):48832-41.
9. Zhang Z, Ramnath N, Nagrath S. Current Status of CTCs as Liquid Biopsy in Lung Cancer and Future Directions. *Front Oncol.* 2015; 5(209):1-11
10. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clin Chem.* 2015; 61(1):112-23.
11. Wilson TR, Lackner MR. Changing the paradigm: circulating tumor DNA as a «liquid biopsy» for clinical biomarker assessments. *Clin Invest.* 2014;4(12):1083-93.
12. Takai E, Yachida S. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy target for detection of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(38):8480-8.
13. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(8):472-84.
14. Ståhlberg A, Krzyzanowski PM, Jackson JB, Egyud M, Stein L, Godfrey TE. Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA enables sensitive mutation detection in liquid biopsies using sequencing. *Nucleic Acids Res [Internet].* 2016 [consultado 16 agosto 2020];44(11):e105.
15. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer. *Clin Chem.* 2013;59(1):110-8.
16. Onstenk W, Sieuwerts AM, Mostert B, Lalmahomed Z, Bolt-de Vries JB, van Galen A, et al. Molecular characteristics of circulating tumor cells resemble the liver metastasis more closely than the primary tumor in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016;7(37):59058-69.
17. Lianidou ES, Mavroudis D, Sotiropoulou G, Agelaki S, Pantel K. What's new on circulating tumor cells? A meeting report. *Breast Cancer Res [Internet].* 2010 [consultado 16 agosto 2020];12(4). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/bcr2601>
18. Cervantes Arias A, Argyle DJ. Transición epitelial-mesenquimal en cáncer mamario [Internet]. [citado 16 agosto 2020]. Disponible en: http://www.mufm.fr/sites/mufm.univ-toulouse.fr/files/evenement/symposium/ponencias/alejandro_cervantes_arias.pdf
19. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol [Internet].* 2017 [consultado 16 agosto 2020]; Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2017.14>
20. Ravelli A, Reuben JM, Lanza F, Anfossi S, Cappelletti MR, Zanotti L, et al. Breast cancer circulating biomarkers: advantages, drawbacks, and new insights. *Tumor Biol.* 2015;36(9):6653-65.
21. Diccionario de cáncer [Internet]. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2021 [consultado 16 agosto 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario>
22. Song Y, Tian T, Shi Y, Liu W, Zou Y, Khajvand T, et al. Enrichment and single-cell analysis of circulating tumor cells. *Chem Sci.* 2017;8(3):1736-51.
23. Barcat JA. Biopsia líquida. *Medicina (Mex).* 2015;75(3):187-9
24. Murtaza M, Dawson S-J, Tsui DWY, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature.* 2013;497(7447):108-12.
25. Bianchi F. Molecular profile of liquid biopsies: next generation biomarkers to improve lung cancer treatment. *Cancer Med Sci [Internet].* 2015 [consultado 16 agosto 2020];9. Disponible en: <http://www.ecancer.org/journal/9/full/598-molecular-profile-of-liquid-biopsies-next-generation-biomarkers-to-improve-lung-cancer-treatment.php>
26. Poulet G, Massias J, Taly V. Liquid Biopsy: general concepts. *Acta Cytol.* 2019;63(6):449-455.
27. Ilié M, Hofman P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(4):420-3.

28. Aghamir S, Heshmat R, Ebrahimi M, Khatami F. Liquid biopsy: the unique test for chasing de genetics of solid tumors. Epigenet Insights. 2020;13:1-7.
29. Biopsia líquida: la técnica que revoluciona la Oncología [Internet]. Salud Digital, 30 de enero de 2016 [consultado 16 agosto 2020]. Disponible en: <http://consalud.es/saludigital/revista/biopsia-liquida-la-tecnica-que-revoluciona-la-oncologia-107>
30. Arechederra M, Ávila M, Berasain C. La biopsia líquida en el manejo del cáncer: una nueva herramienta revolucionaria de la medicina de precisión, aún con limitaciones. Adv Lab Med. 2020;2020200038.

LA BIOINFORMÁTICA EN LA INTERPRETACIÓN DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA

Autores: José Miguel Lezana Rosales, Juan Francisco Quesada Espinosa, María José Gómez Rodríguez

Servicio de Genética. Hospital 12 de Octubre. Madrid

Palabras clave: Secuenciación masiva, Bioinformática, HPO

INTRODUCCIÓN

El genoma humano contiene un total de 60656 genes, de los cuales 19954 son codificantes de proteínas según GENCODE¹. La alteración de las regiones codificantes u otras regiones de los genes (intrónicas flanqueantes, regiones de unión de factores de transcripción, regiones de metilación, etc.) puede dar lugar a enfermedad.

Aunque los trastornos genéticos son poco comunes, en conjunto representan aproximadamente el 70% de las más de 6000 de enfermedades raras descritas². En términos de incidencia, esto se traduce en que aproximadamente 1 de cada 17 personas se encuentra afectada por una enfermedad de etiología genética no oncológica. Además, nuestra constitución genética juega un papel, en mayor o menor medida, en todos los procesos fisiopatológicos, incluidos los trastornos comunes multifactoriales, como la diabetes, hipertensión, obesidad, etc.

En relación a las enfermedades raras, existen actualmente varios interrogantes. Al revisar la literatura científica, se observa una gran disparidad en el número de enfermedades raras descritas. Uno de los motivos de esta variabilidad deriva de la distinta definición de enfermedad rara adoptada por las instituciones sanitarias. Más imprecisa aún resulta la cifra de prevalencia global para cada enfermedad, muy variable en función de la fuente bibliográfica consultada. Además, hay que tener en cuenta que las enfermedades raras se encuentran infradiagnosticadas, especialmente en aquellos países con recursos sanitarios limitados e inaccesibles que, en muchos casos por motivos socioculturales (consanguinidad, aislamiento genético, etc.), representan poblaciones de riesgo para este tipo de enfermedades. Qué número de enfermedades raras tiene una base genética mendeliana, es una cifra aún por dilucidar. Por ello, en muchos casos, no hay acuerdo sobre el número exacto, o no hay fundamentos sólidos en los artículos científicos que respalden los números citados³.

Por otra parte, la introducción de las técnicas de análisis genómico que ha tenido lugar durante la primera década del siglo XXI ha contribuido enormemente al diagnóstico de las enfermedades de etiología genética en los países con mayores recursos sanitarios. Una de estas tecnologías, la secuenciación masiva de ADN (NGS) o de próxima generación, permite el estudio de un elevado número de secuencias de ADN de un paciente en un único ensayo. Sin embargo, aumenta proporcionalmente el volumen de datos generados y la complejidad de su procesamiento. Por ello, el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva ha fomentado el surgimiento y la consolidación de una nueva disciplina biosanitaria, la bioinformática clínica. La

bioinformática clínica es, por tanto, la disciplina sanitaria cuyo objetivo es desarrollar y mejorar las herramientas necesarias para la adquisición, el procesamiento, la organización, el almacenamiento y la explotación del dato genómico con fines diagnósticos.

QUÉ ES LA SECUENCIACIÓN MASIVA

La NGS es una tecnología que emplea la secuenciación en paralelo de millones de pequeños fragmentos de ADN para determinar su secuencia. En contraste con la secuenciación Sanger⁴, la velocidad de secuenciación y cantidad de secuencias de ADN generadas con la NGS son exponencialmente mayores, llevándose a cabo con costes reducidos⁵.

Dentro de la NGS existen diferentes estrategias de abordaje: la secuenciación del genoma completo (WGS), la secuenciación de las regiones codificantes e intrónicas flanqueantes (exoma, WES) y la secuenciación dirigida a paneles de genes. Con la disminución del coste de secuenciación por base, el WES y la WGS han demostrado ser los estudios de primera elección en términos de coste-efectividad y de rendimiento diagnóstico para los pacientes afectados de enfermedades con sospecha de base genética⁶. En este sentido, varios estudios han investigado los beneficios derivados de la aplicación de WES y WGS en la clínica, centrados principalmente en la discapacidad intelectual o las enfermedades mendelianas en general⁷⁻¹².

Teniendo en cuenta que en estudios genéticos de WES el número de variantes de ADN obtenidas es muy elevado (alrededor de 20000-25000 por paciente, en la experiencia en nuestro Servicio de Genética), el reto es determinar cuál o cuáles serían compatibles con el fenotipo clínico del paciente. Para ello es crítico el diseño de una estrategia de filtrado de todas las variantes obtenidas, apoyado en la información de diversas bases de datos genéticas y analizar qué variantes candidatas pueden estar relacionadas con el fenotipo del paciente. Para ello resulta fundamental desarrollar un *pipeline* bioinformático que tenga en cuenta todos estos aspectos.

QUÉ ES LA BIOINFORMÁTICA

Uno de los puntos de inflexión en la explosión de la bioinformática, fue el Proyecto Genoma Humano¹³ donde convergieron la Biología y Genética Molecular con la Computación ante la necesidad de una interpretación de datos biológicos de una magnitud desconocida hasta la época.

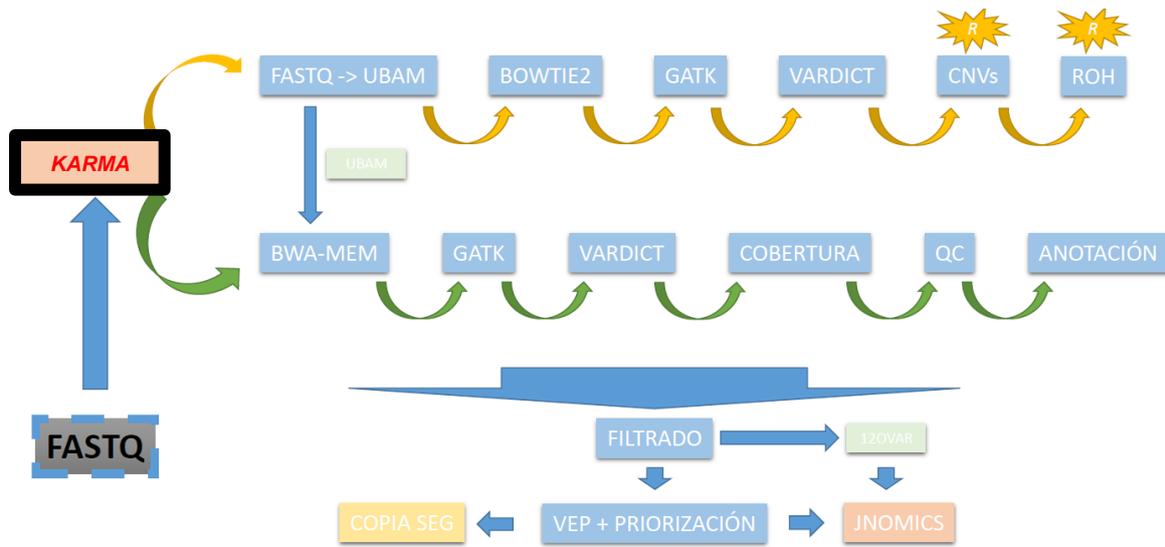


Figura 1. Flujo de procesos del pipeline de análisis Karma. Elaboración propia

A nivel formal, la Bioinformática se podría definir como la disciplina encargada de la resolución de problemas que provienen de la biología mediante metodologías aportadas por la ciencia de la computación¹⁴, o como un conjunto de métodos cuya misión es la extracción de conocimiento biológico a partir de la secuenciación, la expresión, la proteómica y los datos distribuidos del trazado isotópico¹⁵.

En un plano más práctico, la Bioinformática tendría como objetivos el almacenamiento de la información obtenida a partir de los resultados experimentales, el análisis computacional de los datos biológicos y la extracción de toda la información y conocimiento posible. Para ello, resulta imprescindible la creación de bases de datos, el desarrollo de algoritmos y herramientas estadísticas para establecer relaciones entre datos y la implementación de herramientas informáticas que permitan analizar e interpretar estos datos.

QUÉ ES UN PIPELINE DE ANÁLISIS

En el campo que nos ocupa, la Bioinformática resulta crucial en cuanto a que un óptimo diseño de pipeline de análisis permite una reducción fundamental del volumen de información derivada de las secuencias (variantes de ADN) y la interpretación de estas. Para ello se han de tener en cuenta bases de datos diversas y se han de emplear distintos programas, scripts y algoritmos de diseño ad-hoc que nos ayudan, en último término, a desentrañar la causa molecular que subyace en una determinada patología con origen genético.

En nuestro Servicio de Genética, se ha diseñado un pipeline de análisis ad-hoc (en adelante, Karma), que cumple las recomendaciones de validación establecidas por la Association of Molecular Pathology¹⁶. El ámbito de aplicación del pipeline, será, principalmente, el análisis de WES a partir de archivos FASTQ, provenientes del secuenciador masivo (Figura 1).

Karma se encarga, de una manera totalmente automatizada, del procedimiento de alineamiento de estos archivos al genoma de referencia (2 alineadores), a determinar las

variantes con respecto a este genoma (2 genotipadores) para, más adelante, ofrecer un listado de variantes genéticas anotadas (2 anotadores), un análisis de variación en el número de copias (CNVs), determinar presencia de regiones de pérdida de heterocigosidad (ROH), informes de calidad, de cobertura, etc. Los resultados se gestionan y se analizan con un programa de análisis genómico (JNOMICS).

ARCHIVOS FASTQ

En el área de la secuenciación de ADN, el formato de archivo FASTQ¹⁷ se ha convertido un formato común de facto para el intercambio de datos entre las diferentes herramientas. Proporciona una extensión simple del formato FASTA¹⁸ ya que tiene la capacidad de almacenar una puntuación de calidad numérica asociada con cada nucleótido en una secuencia.

Los archivos FASTQ se generan a partir de las lecturas de los fragmentos de ADN que hace el secuenciador.

En detalle, este fichero está compuesto por cuatro tipos de línea que representan a cada una de las secuencias:

- Identificador de la secuencia.
- Secuencia de nucleótidos: Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T). Cuando el secuenciador no es capaz de asignar un nucleótido, se introduce el carácter 'N'.
- Indicador de fin de secuencia e inicio de calidades asociadas: carácter '+'. El contenido de este campo es opcional, la línea puede constar únicamente de dicho carácter.
- Calidades Phred¹⁹, codificadas por un conjunto de caracteres ASCII.

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS. SAM/BAM

Un paso clave en el análisis de secuencias es el alineamiento de estas a un genoma de referencia. Para ello existen diversos programas que gestionan el alineamiento, como BWA²⁰ y Bowtie 2²¹, generando como resultado un archivo SAM²² o su correspondiente archivo binario BAM.

El papel trascendental de los alineadores es que reducen muy significativamente, mediante diferentes heurísticas como los algoritmos de Burrows-Weeler²³ o Needleman-Wunsch²⁴, el tiempo requerido de alinear millones de secuencias a un genoma de referencia. Si se empleara una estrategia de “fuerza bruta”, el procedimiento simplemente no sería abordable.

Un aspecto crítico en este paso es que los programas han de permitir el alineamiento imperfecto de las secuencias al genoma de referencia, con el fin de que secuencias con algún cambio con respecto a la referencia se alineen a ella y posteriormente se puedan detectar dicho(s) cambio(s). Los alineadores también han de tener la capacidad de discriminar entre posibles alineamientos múltiples, llevando a cabo el más específico posible.

Hay que tener en cuenta que el proceso de alineamiento de secuencias cortas, como las empleadas en WES, tiene limitaciones. Por ejemplo las que se dan en regiones con elevada homología en el genoma (como pseudogenes con identidad cercana a 100%): en ellas los alineadores no tienen especificidad suficiente para discriminar si la lectura pertenece a una u otra región. Cabe decir que existen repositorios en la red donde se pueden identificar las regiones cuya secuenciación es dificultosa²⁵.

ARCHIVO DE VARIANTES. VCF

El archivo VCF²⁶ es un formato de archivo de texto que contiene líneas de metainformación, un encabezado y a continuación líneas de datos, cada una con información sobre una posición en el genoma en donde ocurre un evento de variación.

Para la generación de estos archivos se emplean genotipadores como GATK²⁷⁻²⁹ o VarDict³⁰ (son los utilizados en el Servicio de Genética). Estas herramientas tienen en cuenta, entre otros aspectos, en cuántas lecturas está presente la variante respecto a la referencia y con el grado de fiabilidad de estas. Si se supera cierto umbral en los parámetros de verificación internos de los programas, se genera una línea con la variante en el archivo VCF.

FILTRADO DE VARIANTES

El siguiente paso es poner en contexto el archivo VCF, que sólo caracteriza posicionalmente las variantes en el genoma, y determinar cuáles de ellas serán potenciales candidatas a la hora de diagnosticar un paciente.

En primer lugar se enriquecerá este archivo mediante la adición a cada variante de su nomenclatura HGVS³¹, en qué gen se encuentra y otra información proveniente de bases de datos diversas. Por ejemplo:

- Frecuencia según bases de datos poblacionales: 1000 genomas³², ExAC³³, GnomAD³⁴.
- Identificadores de la variante según repositorios clínicos: ClinVar³⁵, COSMIC³⁶, HGMD³⁷.
- Modo de herencia del gen al que se asocian según OMIM³⁸.
- Predicciones de patogenicidad.
- Etc.

El Servicio de Genética cuenta con una base de datos de desarrollo propio (12OVar) en la que se alojan variantes de más de 2000 exomas (más de 1 millón de variantes únicas). De esta manera se está en disposición de correlacionar variantes entre diferentes pacientes, hacer estudios retrospectivos, de cohortes, etc. Esto representa una herramienta crucial en el reanálisis a posteriori de casos no diagnosticados.

Finalmente, mediante la aplicación *JNOMICS* se interpretan las variantes provenientes de *Karma* (Figura 2). Una vez interpretadas, se generan de manera automatizada los informes diagnósticos. Gracias a *JNOMICS*, además, es posible seguir la traza de los estudios en todo momento pudiéndose gestionar y consultar las diferentes bases de datos que componen su núcleo (paneles virtuales de genes 12OVar, tiempos de respuesta, etc.).

Estudio priorizado con términos HPO

Término HPO	Descripción
HP:0001822	Hallux valgus
HP:0100950	Decreased activity of 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase

Estado de la petición

- Confirmación de la variante
- Estudio familiar
- Valoración en sesión
- Ver en consulta
- Reanotación
- Tabla validada

Fecha de registro: 18-09-2020 **Paciente:** **Información clínica:** Varón de 0 años de edad. Prematuro de 30 semanas, gemelar. Cribado positivo para LCHAD /proteína trifuncional. Estudio bioquímico con mismos resultados. Rogamos estudio genético para confirmación PANEL ENF. DE OXIDACIÓN DE ACIDOS GRASOS PREFERENTE

Centro: H. U. 12 de Octubre **Solicitante:** **Servicio:** PED ENFERMEDADES RARAS HOSPIT. **Estudio solicitado:** Exoma Completo

Tabla de variantes de secuencia

Copiar	12O_class	Chr	Start	Ref	Alt	HPO (%)	HPO relacionados	Score combinado	Gen	COMENTARIO
		Chr	Coord. inicio				Términos HPO	Puntuación	Gen HGNC	
	P	2	26418053	C	G	50	HP:0100950 Decreased ...	3.5	HADHA	
		7	94040362	G	T	50	HP:0001822 Hallux valgus	0.6	COL1A2	
		12	69119617	-	GTTT	50	HP:0001822 Hallux valgus	0	NUP107	

Nº de variantes: 3

Azul: 1 < FP (%) <= 3 Verde: 0 < FP (%) <= 1 Rojo: Sin FP; hom y FP <= 0.5% (FP=frecuencia poblacional)
B o PB en 12Ovar VSCI en 12Ovar FR en 12Ovar P o PP en 12Ovar/ClinVar Filtro no PASS Respuesta a farmacos en ClinVar

Figura 2. Módulo de análisis de variantes de JNOMICS. Elaboración propia

FILTRADO DE VARIANTES EMPLEANDO TÉRMINOS HPO

La ontología del fenotipo humano HPO³⁹ representa una forma de estandarizar el vocabulario médico utilizado para designar las anomalías fenotípicas y los signos clínicos de la enfermedad humana. Su desarrollo se apoya en la literatura médica y en las bases de datos Orphanet⁴⁰, DECIPHER⁴¹ y OMIM³⁸. Actualmente, contiene más de 13,000 términos y más de 156,000 anotaciones a enfermedades hereditarias. Cada término en el HPO describe una anomalía fenotípica y está relacionado con todos aquellos genes para los que la enfermedad asociada puede cursar con la anomalía descrita.

En el nuestro Servicio se ha integrado la priorización de variantes mediante el uso de términos HPO y características inherentes a ellas mismas: frecuencia poblacional, tipo de variante y predicciones de patogenicidad.

Para esta integración, se ha desarrollado un *script* que ordena las variantes filtradas asignando una puntuación a cada variante, teniendo en cuenta lo siguiente:

- Número de los términos HPO utilizados que están relacionados con el gen en el que se localiza la variante (Figura 3).

- Tipo de variante. Mayor puntuación para las variantes radicales y canónicas de *splice*, seguido de las variantes de cambio de sentido y, por último, las sinónimas e intrónicas profundas.
- Predicciones de patogenicidad. Mayor puntuación cuanto mayor es el número de predictores de patogenicidad *in silico* que apoya un efecto deletéreo de la variante genética.
- Frecuencia de la variante en la base de datos poblacional según ExAC³³.

En un estudio publicado por nuestro grupo⁴² se reanalizaron los exomas completos de 33 pacientes con diferentes patologías y con diagnóstico genético molecular positivo (portadores de variantes clasificadas como patogénicas o probablemente patogénicas que explicaban su cuadro clínico y con datos de segregación compatibles).

Como parte de este reanálisis, previamente a la priorización, se filtraron las variantes de potencial bajo impacto según diferentes criterios: frecuencia poblacional, tipo de variante, clasificación de patogenicidad según ClinVar, etc. A continuación se llevó a cabo la priorización puntuando las variantes como se detalló en el anterior punto. Se obtuvieron los siguientes resultados, detallados en la Tabla 1.

HP:0001814	Deep-set nails	3265	HRAS
HP:0001814	Deep-set nails	2146	EZH2
HP:0001814	Deep-set nails	64324	NSD1
HP:0001814	Deep-set nails	8726	EED
HP:0001814	Deep-set nails	23512	SUZ12
HP:0000490	Deeply set eye	1281	COL3A1
HP:0000490	Deeply set eye	84992	PIGY
HP:0000490	Deeply set eye	6913	TBX15
HP:0000490	Deeply set eye	2563	GABRD
HP:0000490	Deeply set eye	91147	TMEM67
HP:0000490	Deeply set eye	2314	FLII
HP:0000490	Deeply set eye	4621	MYH3
HP:0000490	Deeply set eye	6925	TCF4

Figura 3. Extracto de Relación término HPO/genes. Elaboración propia

	Score Absoluto ¹	Score absoluto filtrado ²	Score combinado ³	Score combinado filtrado ⁴
Media	7,81	4,47	3,125	1,43
SD	11,86	7,47	5,42	0,87
Mediana	2	1	1	1

Tabla 1. Resultados posicionales de las variantes según diferentes scores empleados en la priorización. ¹Generado sólo teniendo en cuenta el porcentaje de términos HPO que se relaciona con cada gen asociado a la variante. ²Generado sólo teniendo en cuenta el porcentaje de términos HPO que se relaciona con cada gen asociado a la variante, eliminando variantes artefactuales manualmente. ³Generado según lo descrito anteriormente ⁴Generado según lo descrito anteriormente, eliminando variantes artefactuales manualmente. Elaboración propia

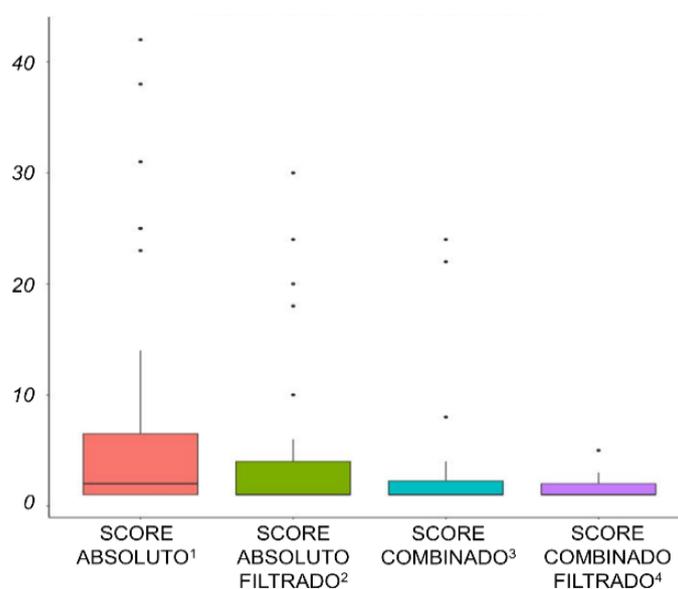


Figura 4. Distribución de posiciones en la tabla de las variantes causales tras aplicar priorizaciones según los diferentes scores. Elaboración propia

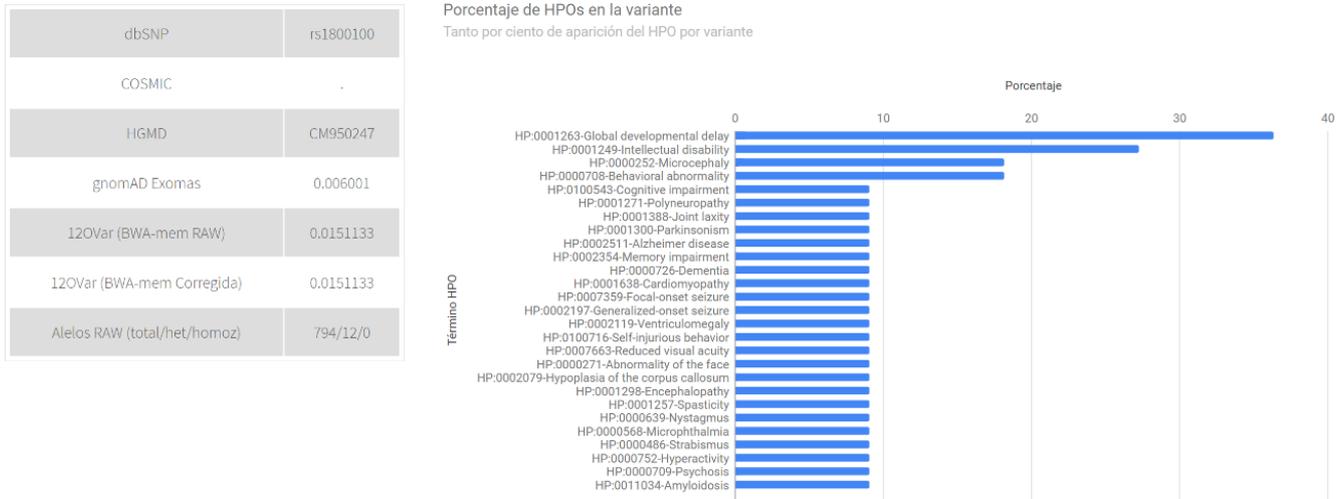


Figura 5. Visualización en JNOMICS de la una variante en la base de datos 12OVar enriquecida con términos HPO. Elaboración propia

Como queda demostrado en este estudio, la integración de los términos HPO en el análisis de datos de exoma permite detectar variantes asociadas a las patologías de forma más eficiente frente al uso de paneles virtuales, ya que las variantes potencialmente candidatas se encuentran priorizadas en las primeras posiciones de la tabla de variantes.

Este sistema de priorización representaría, por tanto, el primer abordaje para el análisis de variantes genéticas procedentes de secuenciación del exoma completo y un complemento al análisis mediante el uso de paneles virtuales de genes o al análisis de exoma completo.

OTROS ANÁLISIS POSIBLES A PARTIR DE DATOS DE EXOMA

Además del análisis de variantes de pequeño tamaño, a partir de Karma es posible realizar diferentes análisis complementarios para enriquecer al máximo la información y completar el diagnóstico:

- QC:
 - Como en todo procedimiento analítico, es necesario llevar a cabo un control de calidad de los datos. En este caso, se analiza el estado de diferentes ficheros que comprenden el análisis
 - FASTQ: Mediante la adaptación del programa FastQC⁴³.
 - BAM: Scripts propios que evalúan cómo ha transcurrido el alineamiento (% off-target, uniformidad, % de duplicados...).
 - VCF: Determinación del número total de variantes, ratio variantes heterocigotas/homocigotas, determinación de contaminaciones cruzadas...

- Cobertura:
 - Se evalúa la cobertura vertical media correspondiente al conjunto de genes, a cada gen en particular y se determina el % de bases y qué regiones que han superado o no determinados umbrales de cobertura.
- CNVs (Figura 6):
 - A partir de una línea base de alineamientos de muestras previamente secuenciadas, se compara exón a exón la cobertura y se determina en qué ventanas de exones hay una discrepancia entre la cobertura esperada y la observada, lo cual se correlaciona con deleciones o duplicaciones⁴⁴.

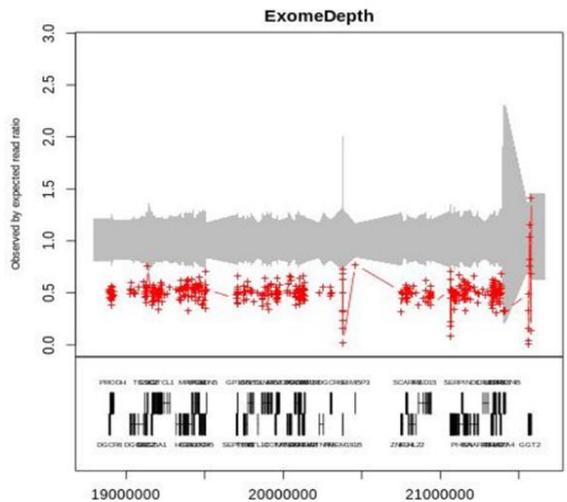


Figura 6. Deleción en heterocigosis que comprende varios genes detectada por Karma. Elaboración propia

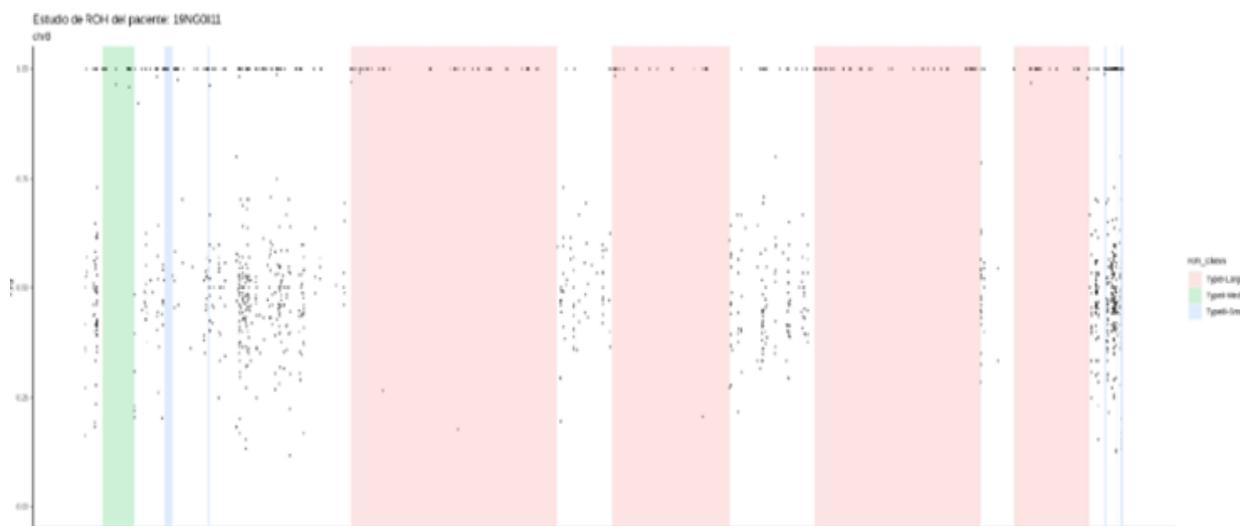


Figura 7. Regiones cromosómicas con pérdida de heterocigosidad detectadas por *Karma*. Elaboración propia

- ROH (Figura 7):

Se detectan regiones con pérdida de heterocigosidad a lo largo del genoma, empleando el perfil de variantes del archivo VCF.

RENDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS EN WES EN EL SERVICIO DE GENÉTICA

En nuestra institución, y empleando *Karma* como *pipeline* de análisis y *JNOMICS* como herramienta de gestión e interpretación de variantes, se han completado 2072 estudios (noviembre 2018 – septiembre 2020). Los resultados han sido los siguientes:

- 574 casos diagnosticados.
- 312 casos no concluyentes.
- 1128 casos no informativos.

Esto supone un rendimiento diagnóstico global del 27,7%, en concordancia con otras instituciones que han publicado sus datos: 25%, 26%, 28%, 30%, 52% y 52%^{8,12,45-48}. Cabe decir, que los rendimientos más elevados tienen un sesgo de tipo de paciente y de patología.

Si se desglosan los datos los rendimientos son los siguientes:

- Pediatría: 34%
- Adultos: 24%
- Por enfermedad:
 - Síndrome de Noonan y Rasopatías: 60% (15 de 25).
 - Síndrome de Marfan y Aortopatías: 50% (22 de 44).
 - Discapacidad intelectual: 43,5% (71 de 163).
 - Hipoacusia: 41% (52 de 127).
 - Hipercolesterolemia familiar: 31% (34 de 110).
 - Autismo: 14,5% (7 de 48).

Del total de estudios diagnosticados, 38 del ellos (6,6%) contienen una CNV patogénica.

Como acciones de mejora a futuro, para mejorar los rendimientos diagnósticos está el reanálisis de los estudios no informativos, empleando nuevos abordajes, ampliando el espectro de análisis a otros genes que se hayan descrito recientemente, etc⁴⁹.

LIMITACIONES EN EL ANÁLISIS DE WES

Las limitaciones principales en el análisis de WES son:

- Sólo aborda las regiones codificantes e intrónicas flanqueantes, que suponen el 1,5-2% del genoma.
- Técnica dependiente de captura: existen regiones, como las de baja complejidad o ricas en nucleótidos GCs que no se capturan (y por ende se secuencian) con eficiencia.
- Identificación de grandes deleciones e inserciones (>21 nucleótidos): en abordajes de NGS con lecturas cortas identificar este tipo de variantes es difícil. Sin embargo, mediante *Karma* se han detectado eventos con más de 50 nucleótidos de longitud.
- Identificación de CNVs: aunque es posible, está limitada si la captura no ha sido uniforme y también es poco sensible si el número de exones afectados es bajo.
- Reordenamientos genómicos.
- Disomías uniparentales.
- Variaciones epigenéticas.
- Mutaciones en mosaico: debido a que la profundidad de lectura no resulta suficiente en muchos casos para detectar este tipo de eventos donde la frecuencia de alelo alternativo es baja.
- Regiones repetitivas, pseudogenes. Se comentó como una de las limitaciones derivadas del alineamiento de secuencias.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Frankish A, Diekhans M, Ferreira AM, Johnson R, Jungreis I, Loveland J, et al. GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jan 8 [consultado 15 octubre 2020];47(D1):D766–73. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gky955>
2. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, et al. European Journal of Human Genetics Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2020 [consultado 29 octubre 2020];28(2):165-73. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>
3. Ferreira CR. The burden of rare diseases. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2019 [consultado 26 octubre 2020];179(6):885–92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30883013/>
4. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1977 [consultado 26 octubre 2020];74(12):5463–7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/271968/>
5. Voelkerding K V., Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* [Internet]. 2009 [consultado 15 octubre 2020];55(4):641–58. Disponible en: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>
6. Chief Medical Officer. Chief Medical Officer annual report 2016: generation genome [Internet]. [consultado 15 octubre 2020]. London: Department of Health & Social Care; 2017. Disponible en: <https://www.gov.uk/government/publications/chief-medical-officer-annual-report-2016-generation-genome>
7. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BWM, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, et al. Diagnostic Exome Sequencing in Persons with Severe Intellectual Disability. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Nov 15 [consultado 15 octubre 2020];367(20):1921–9. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1206524>
8. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare mendelian disorders. *JAMA* [Internet]. 2014 Nov 12 [consultado 15 octubre 2020];312(18):1880–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/jama.2014.14604>
9. Sawyer SL, Hartley T, Dyment DA, Beaulieu CL, Schwartzentruber J, Smith A, et al. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: Time to address gaps in care. *Clin Genet* [Internet]. 2016 [consultado 15 octubre 2020];89(3):275–84. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/cge.12654>
10. Taylor JC, Martin HC, Lise S, Broxholme J, Cazier JB, Rimmer A, et al. Factors influencing success of clinical genome sequencing across a broad spectrum of disorders. *Nat Genet* [Internet]. 2015 Jun 26 [consultado 15 octubre 2020];47(7):717–26. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ng.3304>
11. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical Whole-Exome Sequencing for the Diagnosis of Mendelian Disorders. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Oct 17 [consultado 15 octubre 2020];369(16):1502–11. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1306555>
12. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA* [Internet]. 2014 Nov 12 [consultado 15 octubre 2020];312(18):1870–9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4326249/pdf/nihms661397.pdf>
13. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* [Internet]. 2001 Feb 15 [consultado 15 octubre 2020];409(6822):860–921. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/35057062>
14. Backofen R, Gilbert D. Bioinformatics and constraints. *Constraints*. 2001 Jun;6(2–3):141–56.
15. Stephanopoulos G. Bioinformatics and metabolic engineering. *Metab Eng* [Internet]. 2000 [consultado 15 octubre 2020];2(3):157–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1006/mben.2000.0157>
16. Roy S, Coldren C, Karunamurthy A, Kip NS, Klee EW, Lincoln SE, et al. Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. *J Mol Diagn* [Internet]. 2018 [consultado 15 octubre 2020];20(1):4–27. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.11.003>
17. Cock PJA, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2010 Apr [consultado 22 febrero 2017];38(6):1767–71. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1137>
18. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1988 [consultado 15 octubre 2020];85(8):2444–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2444>
19. GATK Team. Phred-scaled quality scores – GATK [Internet]. Cambridge, MA: Broad Institute; 2021 [consultado 15 octubre 2020]. Disponible en: <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035531872-Phred-scaled-quality-scores>
20. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* [Internet]. 2009 Jul 15 [consultado 12 febrero 2017];25(14):1754–60. Disponible en: <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>

21. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* [Internet]. 2012 Apr [consultado 10 julio 2014];9(4):357–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1923>
22. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* [Internet]. 2009 Aug 15 [consultado 14 febrero 2017];25(16):2078–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505943>
23. Burrows M, Burrows M, Wheeler DJ. A block-sorting lossless data compression algorithm. 1994 [consultado 15 octubre 2020]; Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.121.6177>
24. Needleman SB, Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol.* 1970 Mar 28;48(3):443–53.
25. GitHub. Genome-stratifications/GRCh37. Genome-in-a-bottle. Genome-stratifications [Internet]. GitHub; 2021 [consultado 15 octubre 2020]. Disponible en: <https://github.com/genome-in-a-bottle/genome-stratifications/tree/master/GRCh37>
26. The Variant Call Format (VCF) Version 4.2 Specification. 2020.
27. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella K V, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* [Internet]. 2011 Apr 10 [consultado 12 febrero 2017];43(5):491–8. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.806>
28. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, et al. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010 Sep;20(9):1297–303.
29. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinforma.* 2013;43(1110):11.10.1-11.10.33
30. Lai Z, Markovets A, Ahdesmaki M, Chapman B, Hofmann O, Mcewen R, et al. VarDict: A novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016 Jun 20 [consultado 15 octubre 2020];44(11):108. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw227>
31. Den Dunnen JT, Antonarakis E. Nomenclature for the description of human sequence variations [Internet]. *Human Genetics.* Hum Genet; 2001 [consultado 15 octubre 2020];109(1):121–4. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s004390100505>
32. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Bentley DR, Chakravarti A, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* [Internet]. 2015 Sep 30 [consultado 30 septiembre 2015];526(7571):68–74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature15393>
33. Consortium EA, Lek M, Karczewski K, Minikel E, Samocha K, Banks E, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans [Internet]. *bioRxiv.* Cold Spring Harbor Labs Journals; 2015 Oct [consultado 31 octubre 2015]. Disponible en: <http://biorxiv.org/content/early/2015/10/30/030338.abstract>
34. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* [Internet]. 2020 May 28 [consultado 15 octubre 2020];581(7809):434–43. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
35. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2015 Nov 17 [consultado 6 enero 2016];44(D1):D862–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1222>
36. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jan 8 [consultado 15 octubre 2020];47(D1):D941–7. Disponible en: <https://cancer.sanger.ac.uk>
37. Stenson PD, Ball E V, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NST, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* [Internet]. 2003 Jun [consultado 7 marzo 2016];21(6):577–81. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/humu.10212>
38. Hamosh A, Scott AF, Amberger J, Valle D, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Hum Mutat* [Internet]. 2000 [consultado 15 octubre 2020];15(1):57–61. Disponible en: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200001\)15:1<57::AID-HUMU12>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<57::AID-HUMU12>3.0.CO;2-G)
39. Köhler S, Carmody L, Vasilevsky N, Jacobsen JOB, Danis D, Gouridine JP, et al. Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jan 8 [consultado 15 octubre 2020];47(D1):D1018–27. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1105>
40. Weinreich SS, Mangon R, Sikkens JJ, Teeuw ME, Cornel MC. Orphanet: Een Europese database over zeldzame ziekten. *Ned Tijdschr Geneeskd* [Internet]. 2008 Mar 1 [consultado 15 octubre 2020];152(9):518–9. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/18389888>
41. Firth H V., Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2009 Apr 10 [consultado 15 octubre 2020];84(4):524–33. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.010>

42. Tuñón Le Poutel D, Lezana Rosales JM, Soengas Gonda EM, Eguiburu Jaime JL, Sánchez Calvín MT, Quesada Espinosa JF. Construcción y evaluación de un algoritmo de priorización de variantes de exoma empleando términos HPO [Internet]. Congreso Virtual LabClin; 2020. Disponible en: <https://www.labclin2020.es/index.php/bienvenida>
43. Andrews S. FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data. BibSonomy [Internet]. [consultado 15 octubre 2020]. Disponible en: <https://www.bibsonomy.org/bibtex/f230a919c34360709aa298734d63dca3>
44. Plagnol V, Curtis J, Epstein M, Mok KY, Stebbings E, Grigoriadou S, et al. A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling. *Bioinformatics* [Internet]. 2012 Nov 1 [consultado 12 febrero 2017];28(21):2747–54. Disponible en: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/bts526>
45. Ji J, Shen L, Bootwalla M, Quindipan C, Tatarinova T, Maglinte DT, et al. A semiautomated whole-exome sequencing workflow leads to increased diagnostic yield and identification of novel candidate variants. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* [Internet]. 2019 [consultado 15 octubre 2020];5(2). Disponible en: <https://doi.org/10.1101/mcs.a003756>
46. Farwell KD, Shahmirzadi L, El-Khechen D, Powis Z, Chao EC, Tippin Davis B, et al. Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: Results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. *Genet Med* [Internet]. 2015 Jul 2 [consultado 15 octubre 2020];17(7):578–86. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/gim.2014.154>
47. Tan TY, Dillon OJ, Stark Z, Schofield D, Alam K, Shrestha R, et al. Diagnostic impact and cost-effectiveness of whole-exome sequencing for ambulant children with suspected monogenic conditions. *JAMA Pediatr* [Internet]. 2017 Sep 1 [consultado 15 octubre 2020];171(9):855–62. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.1755>
48. Dillon OJ, Lunke S, Stark Z, Yeung A, Thorne N, Gaff C, et al. Exome sequencing has higher diagnostic yield compared to simulated disease-specific panels in children with suspected monogenic disorders. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2018 May 1 [consultado 15 octubre 2020];26(5):644–51. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0099-1>
49. Baker SW, Murrell JR, Nesbitt AI, Pechter KB, Balciuniene J, Zhao X, et al. Automated Clinical Exome Reanalysis Reveals Novel Diagnoses. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2019 Jan 1 [consultado 15 octubre 2020];21(1):38–48. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.07.008>

BLOQUE III

SESIONES DE OTRAS ESPECIALIDADES DEL LABORATORIO

NUEVAS TECNOLOGÍAS EN EL LABORATORIO CORE DE HEMATOLOGÍA

Autores: Fernando Calvo Boyero¹, Javier Hernando Redondo², Maite Serrando Quero²

¹Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de octubre

²Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Josep Trueta, Girona

Palabras clave: Hematimetría, Citometría de Flujo, Hematología

INTRODUCCIÓN

En el laboratorio de hematología contamos con diferentes herramientas que nos permiten llegar a un diagnóstico. Estas incluyen los criterios internos del analizador, tanto los valores cuantitativos de las poblaciones celulares habituales (linfocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos) como los criterios cualitativos, y las alarmas que proporcionan los equipos.

Una buena estrategia es la elaboración de “reglas expertas” por parte del laboratorio, que se definen como algoritmos diagnósticos que combinan los criterios anteriores para dar lugar a protocolos de trabajo enfocados a diferentes grupos patológicos con el fin de aumentar la sensibilidad del análisis y llegar a un correcto diagnóstico. Estos protocolos pueden incluir la valoración facultativa del conjunto de estos datos, la realización de pruebas adicionales y la generación de frotis de sangre periférica.

IMPORTANCIA DE LA HEMATIMETRÍA

La hematimetría es el primer paso de la valoración de las poblaciones celulares sanguíneas normales. En este estudio se van a cuantificar y clasificar los diferentes grupos celulares, incluyendo la serie roja (hematíes y precursores), serie plaquetar (trombocitos) y serie blanca, con sus diferentes subpoblaciones leucocitarias (Linfocitos, Neutrófilos, Monocitos, Eosinófilos, Basófilos y células precursoras).

Es importante para la detección de patología (tanto hematológica, como no hematológica), para el seguimiento y

monitorización de pacientes previamente diagnosticados y para la evaluación de la eficacia de determinados tratamientos, como por ejemplo la evolución de la población de neutrófilos en un paciente con un proceso infeccioso.

Existen varios analizadores hematológicos comerciales en el mercado. Los dos métodos que más conocemos son la Dispersión de luz láser a diferentes ángulos utilizada por *Beckman Coulter* y la Citometría de Flujo con Fluorescencia utilizada por *Sysmex* para la diferenciación celular.

La tecnología de *Beckman Coulter* se basa en la impedancia para el conteo celular y el *Automated Intelligent Morphology* para la clasificación celular. Esta tecnología se basa en la medida de tres parámetros: Volumen, Conductividad y Dispersión (*Scatter*), que se correlacionan con el tamaño celular, la estructura nuclear y la estructura interna respectivamente.

Además, los equipos más modernos permiten la determinación de múltiples ángulos de dispersión de cada célula, lo que permite calcular unos parámetros conocidos como *Cell Population Data* (CPD) que aportan información de las células en un ambiente cercano al del cuerpo humano y se están investigando como biomarcadores de utilidad en diversas situaciones.

La tecnología de *Sysmex* se fundamenta en la citometría de flujo con fluorescencia, en la que se utilizan fluorocromos que se impregnan en las células tras sufrir estas un proceso de permeación de su membrana celular. Mediante una luz láser enfocada a las células se obtienen tres parámetros: *Forward Scatter Light* (FSC), *Side Scatter Light* (SSC) y *Side Fluorescence Light* (SFL), que se correlacionan con el

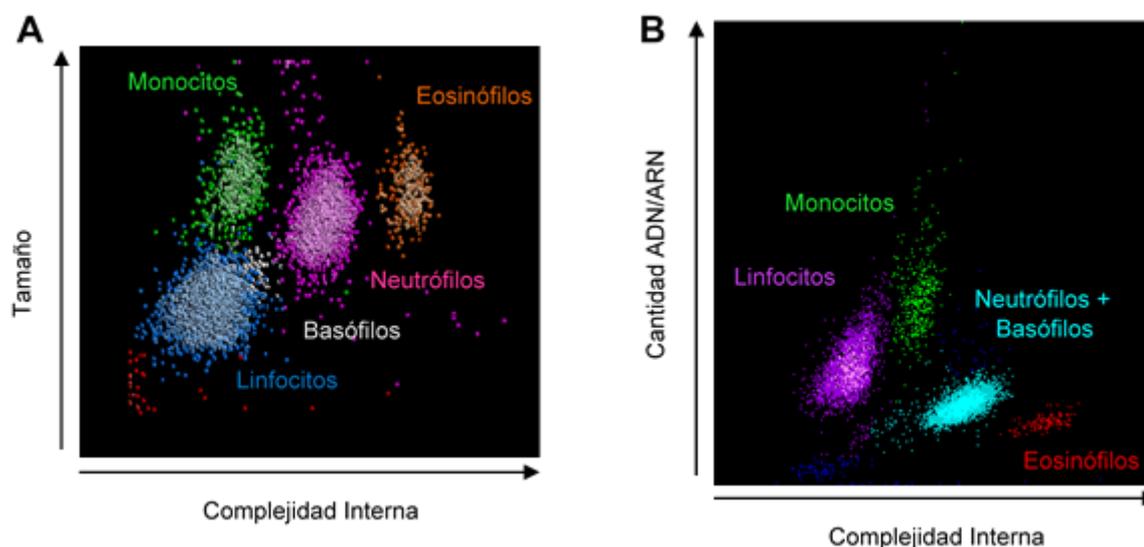


Figura 1. Scattergramas de Beckman Coulter (A) y Sysmex (B). Elaboración propia

tamaño celular, la estructura celular interna y el contenido en ácidos nucleicos respectivamente.

Ambas tecnologías permiten obtener unos gráficos de dispersión conocidos como *scattergramas* que clasifican las poblaciones celulares dentro de las categorías de Neutrófilos, Linfocitos, Monocitos, Eosinófilos y Basófilos. Además, existen alarmas que aparecen cuando el algoritmo matemático que utilizan los equipos supera el valor límite *trigger* al detectar la presencia de las células anómalas. En el caso de *Sysmex*, tenemos la posibilidad de generar test adicionales utilizando diferentes reactivos químicos, lo que permite clasificar de forma más precisa diferentes poblaciones celulares.

FRACCIÓN DE PLAQUETAS INMADURAS

En el caso de la serie plaquetar, un parámetro interesante es el conteo de plaquetas por fluorescencia (PLT-F), que permite determinar la fracción de plaquetas inmaduras (IPF, *Immature Platelet Fraction*).

Este parámetro determina el porcentaje de plaquetas reticuladas (correspondiente a plaquetas inmaduras), lo que indica la producción de plaquetas a nivel medular, y es de gran utilidad en el diagnóstico diferencial de destrucción periférica de plaquetas, como en el caso de una Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT) o una Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI) frente a la inhibición o insuficiencia de la médula ósea para su generación¹.

Este parámetro también ha sido utilizado en la literatura para evaluar la recuperación trombopoyética durante una anemia aplásica causada por la quimioterapia y considerar la necesidad de una transfusión plaquetar².

Un ejemplo del uso de este biomarcador son los *scattergramas* observados en la Figura 2. En el primero encontramos una plaquetopenia de 70×10^3 plaquetas/uL con un IPF elevado (26,1%), lo que indica una elevada producción medular plaquetar. Finalmente, el paciente es diagnosticado con una Trombopenia Autoinmune (PTI), lo que está en consonancia con los resultados obtenidos.

En el segundo caso encontramos una importante trombocitosis (967×10^3 plaquetas/uL) con un IPF disminuido (2,1%). El paciente tiene una trombocitosis secundaria a una esplenectomía por un Síndrome Linfoproliferativo.

ERITROCITOS NUCLEADOS

Un parámetro de amplia utilidad en la evaluación de la serie roja es la cantidad de eritrocitos nucleados o

Nucleated Red Blood Cells (NRBC). Estas células tienen un núcleo y un tamaño celular muy parecido al de un linfocito, por lo que varios analizadores de hematología los identifican erróneamente.

Esta población celular se puede encontrar presente cuando existe un aumento extremo en la actividad hematopoyética de la médula ósea, como ocurre en episodios hemolíticos agudos o sepsis, en algunas hemoglobinopatías o como resultado de una invasión medular consecuencia de ciertas patologías hematológicas. También puede aparecer de forma fisiológica en neonatos o recién nacidos prematuros.

El recuento de los eritroblastos además es importante para el diagnóstico diferencial de una anemia grave y puede servir para la monitorización del paciente e incluso para determinar las necesidades de transfusión³.

En la Figura 3a podemos observar los *scattergramas* de un paciente en los que se observa una población de eritrocitos nucleados de 3,6 células por cada 100 leucocitos con una hemoglobina normal (14,1 g/dL; VR: 13,5-17,2) con microcitosis (VCM 71,3 fL; VR: 80-100).

Al realizar el frotis de sangre periférica (Figura 3b) se confirmó la presencia de eritroblastos y se observó una serie roja con distribución anormal de la hemoglobina y presencia de abundantes dianocitos. Se descubrió así mismo un cristal de hemoglobina C (marcado en rojo). Tras la realización de un estudio de cadenas de hemoglobina por HPLC, se descubrió una hemoglobina C homocigota y se derivó al paciente a consultas externas de hematología.

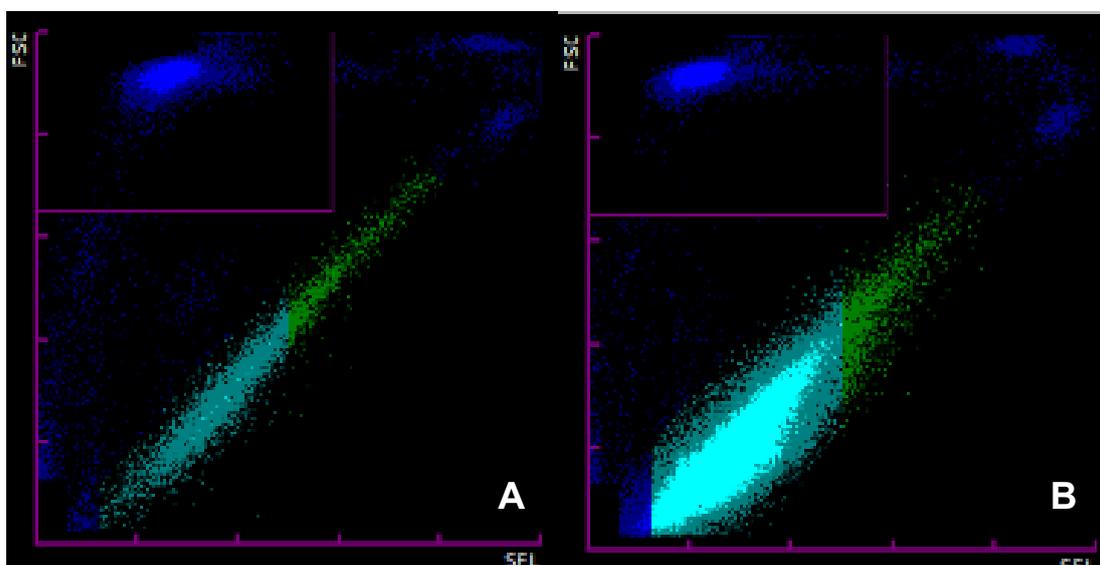


Figura 2. *Scattergramas* que corresponden a un IPF elevado (A) y un IPF disminuido (B). Elaboración propia

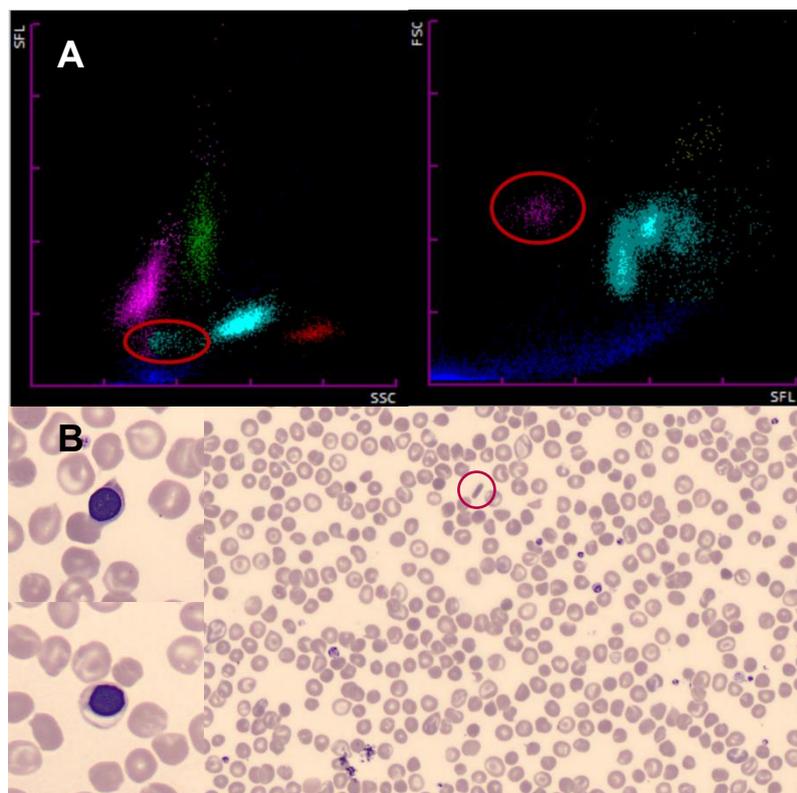


Figura 3. a) Scattergramas de un paciente donde se observa una población anormal de eritroblastos marcada en rojo. b) Frotis de Sangre periférica donde se observan eritroblastos (izquierda) y un cristal de hemoglobina C (derecha). Adaptado de: Calvo F, 2019

RECuento DE GRANULOCITOS INMADUROS (IG)

El aumento de los granulocitos inmaduros en la sangre periférica (mielemia) suele indicar una respuesta en su fase inicial de una infección, una inflamación u otros estímulos a nivel de la médula ósea. Este parámetro permite una discriminación rápida y temprana entre infecciones bacterianas y víricas, un apoyo al uso de otros parámetros inflamatorios como la PCR o las interleucinas y la monitorización de los pacientes infectados.

Existen varias situaciones en las que el uso de medicamentos incrementa esta población. El más conocido es el uso de Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF), utilizado en pacientes oncológicos para la recuperación del sistema inmune. Un caso menos conocido es el uso de corticoterapia.

En el siguiente caso (Figura 4a) se observa la gráfica de una mujer de 41 años en seguimiento por endocrinología en la que se observa trombocitosis (571×10^3 plaquetas/uL), leucocitosis ($21,99 \times 10^3$ leucocitos/uL), neutrofilia absoluta ($16,67 \times 10^3$ células/uL) y discreta monocitosis ($1,23 \times 10^3$ células/uL). Se observa una población de granulocitos inmaduros de $1,86 \times 10^3$ células/uL, lo que se observa como una población de alta fluorescencia por encima de la población de neutrófilos.

La mielemia se confirma mediante revisión del frotis de sangre periférica donde se observa así mismo una intensa granulación. Revisada la historia clínica y teniendo en cuenta que los marcadores inflamatorios son negativos, se sugiere revisar las causas farmacológicas, como el uso de

corticoides, que pueden explicar esta población anormal. Otra situación en la que aumentaría esta población es la leucemia mieloide crónica. El siguiente caso (Figura 4b) corresponde a un varón de 24 años sin antecedentes de interés. En el análisis hematimétrico se observa una leucocitosis muy marcada ($155,89 \times 10^3$ leucocitos/uL) principalmente debida al aumento de neutrófilos ($130,75 \times 10^3$ células/uL), dentro de los cuales $48,38 \times 10^3$ células/uL (37 % de la población de neutrófilos) corresponden a granulocitos inmaduros. Además, se observa trombocitosis (775×10^3 plaquetas/uL), basofilia ($10,23 \times 10^3$ células/uL, un 6,5 % del total de leucocitos) y presencia de 14 eritroblastos por cada 100 leucocitos. La fórmula se confirma por microscopía digital.

CÉLULAS PRECURSORAS DE LEUCOCITOS

El canal *WPC* (*White Precursor Cells*) es una modificación del análisis para realizar el diferencial leucocitario (XN-DIFF) en el que usando el mismo procedimiento se varían las concentraciones de polimetina y etilenglicol y se utiliza etanol en lugar de metanol para obtener una clasificación diferente.

Este análisis se utiliza principalmente ante la presencia de alarmas de *Atypical Lymph*, *Abnormal Lymph* o *Blast*. En la primera etapa de la reacción el agente de lisis actúa sobre los lípidos y por tanto el contenido lipídico de la membrana determina la perforación celular y posterior entrada de los fluorocromos.

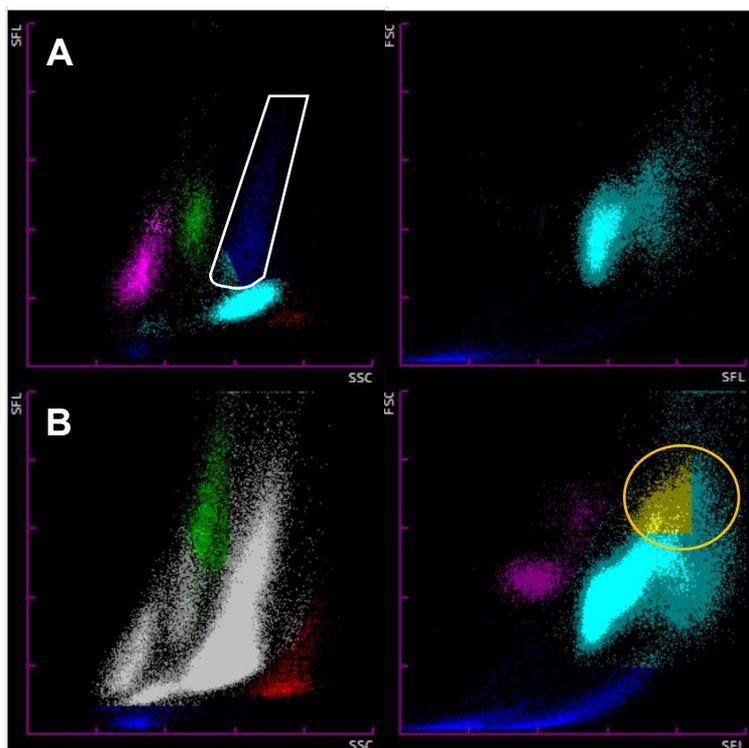


Figura 4. a) Presencia de mielemia. Se señala la población de granulocitos inmaduros. b) Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Se señala la población de basófilos. Elaboración propia

De esta manera, detecta linfocitos anormales, monocitos anormales y blastos, así como granulocitos anormales. Las membranas de los linfocitos anormales tienen un mayor contenido lipídico, por lo que se unen más fluorocromos y por tanto aumenta la *Side-Fluorescence Light*, separando a esta población de los linfocitos normales. Por otro lado, los blastos presentan baja fluorescencia debido al bajo contenido lipídico de la membrana. Combinando la información del tamaño celular, la complejidad intracelular y la intensidad de fluorescencia, podemos mejorar la identificación de estas poblaciones patológicas. La separación se puede observar en la Figura 5.

Un ejemplo del uso de este parámetro lo encontramos en la Figura 6a. En el gráfico *WDF* destaca una población de monocitos con alta fluorescencia ($4,67 \times 10^3$ células/uL) junto

a una bicitopenia (8,3 g/dL de hemoglobina y 19×10^3 plaquetas/uL) en una paciente de 69 años con valores previos normales. En el gráfico de *WPC* destaca una población separada de células que presenta baja fluorescencia. Al revisar el frotis de sangre periférica (Figura 6b), observamos gran cantidad de células blásticas de tipo mieloide con un signo característico de huella dactilar. Esta anomalía morfológica corresponde a una mutación en el gen de la Nucleofosmina, lo que determina una entidad clasificada por la *World Health Organization (WHO)* como *AML with mutation in NPM1 gene*.

El *workflow* del propio analizador realiza un *re-test* por *WPC* en el caso de encontrar una linfocitosis absoluta o la aparición de una alarma *Blast/Abnormal Lymph*. En nuestro caso, ante una linfocitosis $> 5 \times 10^3$ células/uL en adultos o $>$

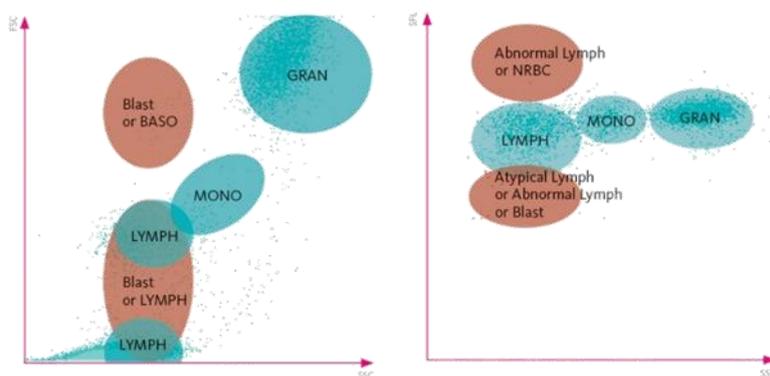


Figura 5. Scattergramas del canal *WPC* de Sysmex. Adaptado de Jones AS, 2015

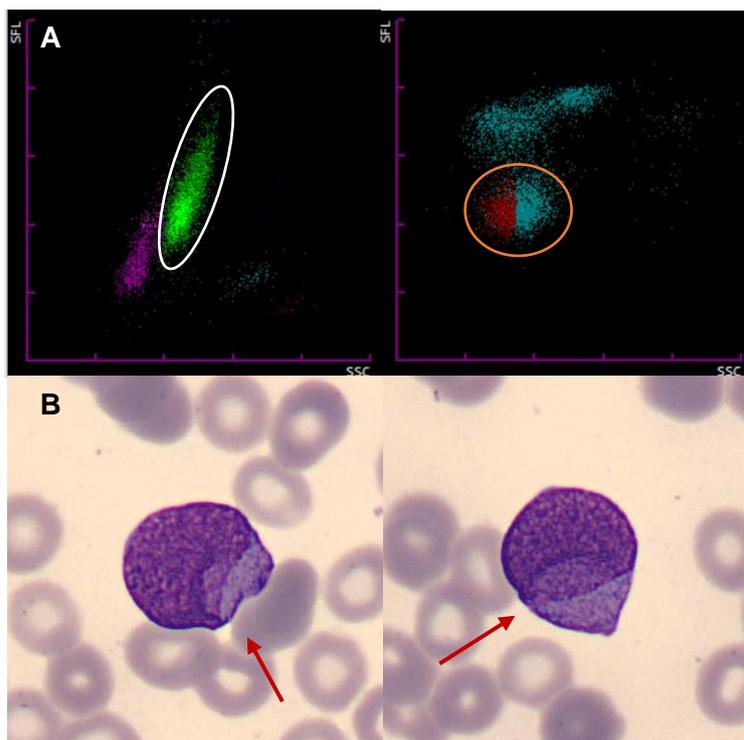


Figura 6. Leucemia Aguda Mieloide. a) Se señala una población anómala de monocitos que en el canal WPC aparece como una población separada y homogénea de células con baja fluorescencia. b) Se observan blastos con el signo de la huella dactilar (señalado).
Elaboración propia

7 x 10³ células/uL en menores de 15 años, sin previo en 20 días en ambos casos, se realiza el *re-test* por WPC, se revisa la historia clínica del paciente y se genera un frotis de sangre periférica.

Si la morfología encontrada en el frotis sanguíneo es sugestiva de una mononucleosis infecciosa, se ampliarán

pruebas bioquímicas (GPT, PCR) y serológicas. En caso contrario se realizaría una citometría de flujo para descartar la clonalidad de la linfocitosis mediante un panel de marcadores monoclonales como el *CytoDiff*, del que hablaremos más adelante.

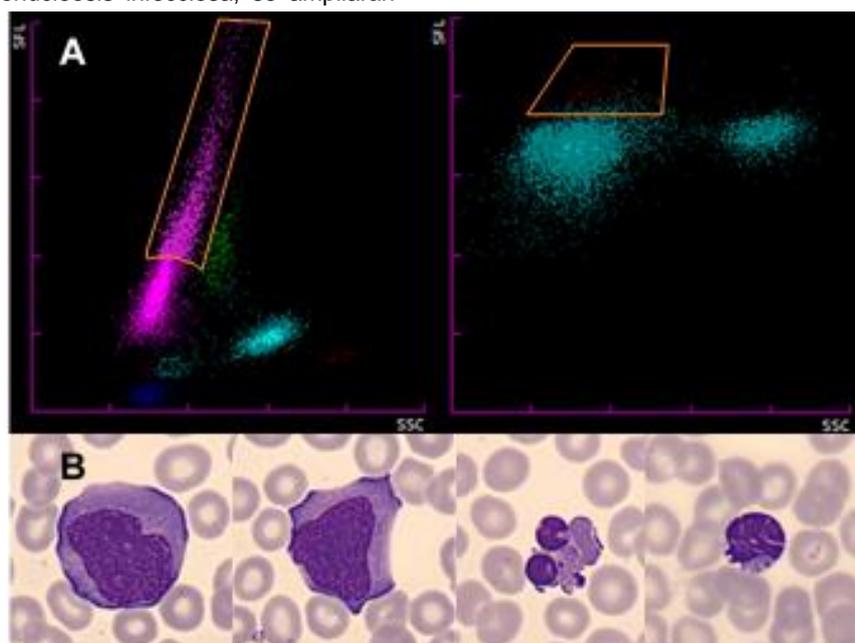


Figura 7. Mononucleosis infecciosa. a) Se señala una población de linfocitos con alta fluorescencia que corresponde a linfocitos estimulados. Esta población se observa en el canal WPC. b) Se observan a la derecha dos linfocitos estimulados y a la izquierda dos linfocitos en apoptosis. Elaboración propia

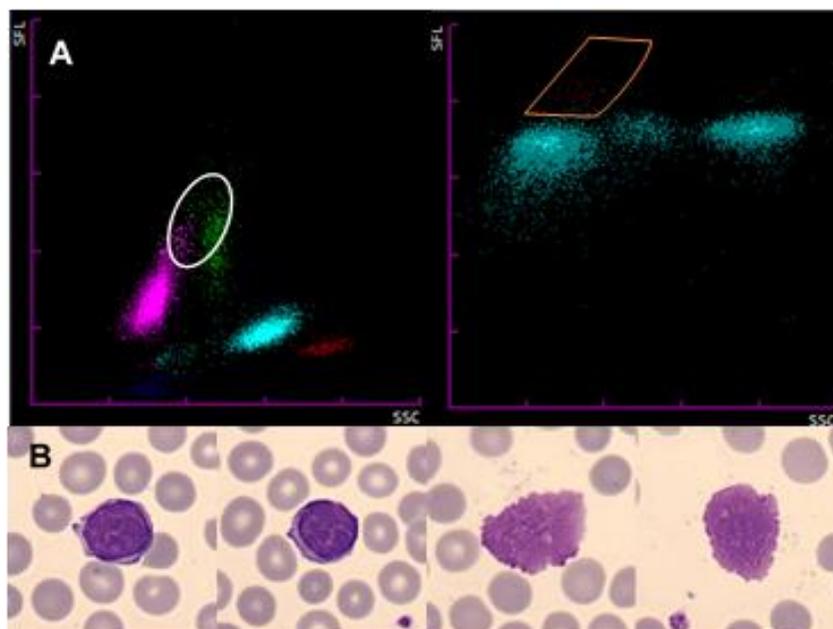


Figura 8. Leucemia Linfática Crónica (LLC). a) Se señala una pequeña población que se solapa con la población de monocitos (izquierda). En el canal *WPC* (derecha) se señala la misma población. b) Se observan dos linfocitos con cromatina en grumelé (izquierda) junto a dos sombras celulares (derecha). Elaboración propia

En el siguiente ejemplo encontramos una linfocitosis de $8,8 \times 10^3$ células/uL en un paciente varón de 12 años. El *scattergrama* observado en el canal *WDF* es sugestivo de síndrome monucleósido, y en el frotis de sangre periférica (Figura 7) se observan abundantes linfocitos estimulados y apoptosis celulares. Finalmente se confirma la positividad de IgM e IgG frente a Citomegalovirus.

Como ejemplo de un síndrome linfoproliferativo (Figura 8), encontramos este caso de una linfocitosis absoluta ($6,1 \times 10^3$ células/uL) que se desplaza hacia una mayor fluorescencia en el *scattergrama*, juntándose con la población de monocitos, activando así el *re-test* de *WPC*, donde se encuentra una pequeña población celular de alta fluorescencia, sugestiva de *abnormal lympho*. En el frotis de sangre periférica observamos linfocitos con condensación anómala de la cromatina en forma de grumelé, unido a abundantes sombras de Gumprecht. Posteriormente, se confirma la linfocitosis B clonal por citometría de flujo con restricción de cadenas.

PANEL CYTODIFF

El panel CytoDiff de *Beckman Coulter* permite separar y clasificar poblaciones celulares mediante una mezcla de seis anticuerpos monoclonales en cinco colores. Este es un análisis pensado para realizarlo en un laboratorio core de hematología, ante la detección de un hemograma o un frotis anormal.

En este análisis se utilizan seis anticuerpos que permiten diferenciar varias poblaciones leucocitarias (Tabla 1). Además, se pueden diferenciar poblaciones que corresponden a granulocitos inmaduros (IG) y a células con marcadores anómalos (Xb, Xm, Xt, Xn) que pueden estar implicadas en procesos patológicos a las que habrá que

realizar una diferenciación posterior con otros anticuerpos para confirmarlo (Figura 9).

Estos parámetros, por tanto, nos aportan información adicional para el diagnóstico y tratamiento del paciente, que complementa los algoritmos diagnósticos basados en reglas expertas de Hematimetría y permiten ampliar o contrastar la información obtenida del frotis de sangre periférica. Por otra parte, son útiles como un test de selección de patología como paso previo a paneles de citometría especializados.

CONCLUSIONES

- La hematimetría es una herramienta fundamental para la correcta interpretación de los parámetros hematológicos y va a ser clave para investigar más profundamente una anomalía celular.
- Es necesario interpretar conjuntamente los parámetros cuantitativos con las alarmas, la citología y las pruebas adicionales que se soliciten o ampliemos.
- Los algoritmos diagnósticos unidos a las alarmas del analizador tienen una gran sensibilidad para la detección de células anormales en el frotis de sangre periférica.
- Los nuevos parámetros de los analizadores pueden proporcionar una información adicional muy valiosa, aunque es necesario evaluarlos internamente para su utilización.
- La citometría de flujo integrada en un laboratorio core aporta información esencial ante las dudas diagnósticas que pueden surgir con las herramientas habituales (hematimetría y citología).

Panel CytoDiff	
Anticuerpo	Población celular
CD36-FITC	Monocitos, Eritroblastos, Plaquetas
CD2-PE	Linfocitos T, Linfocitos Grandes Granulares (células NK), blastos LA-T
CD294-PE	Eosinófilos, Basófilos, Linfocitos T activados
CD19-ECD	Linfocitos B, blastos LA-B
CD16-PC5	Neutrófilos, Monocitos proinflamatorios, linfocitos T/NK CD16-positivos
CD45-PC7	Leucocitos

Tabla 1. Marcadores monoclonales de madurez celular que mediante el software de análisis nos permiten separar e identificar células normales y/o patológicas de forma simultánea (obtención de 13 histogramas). Las células que no presentan señal positiva para ninguno de los marcadores se consideran en este panel posibles células inmaduras. Elaboración propia

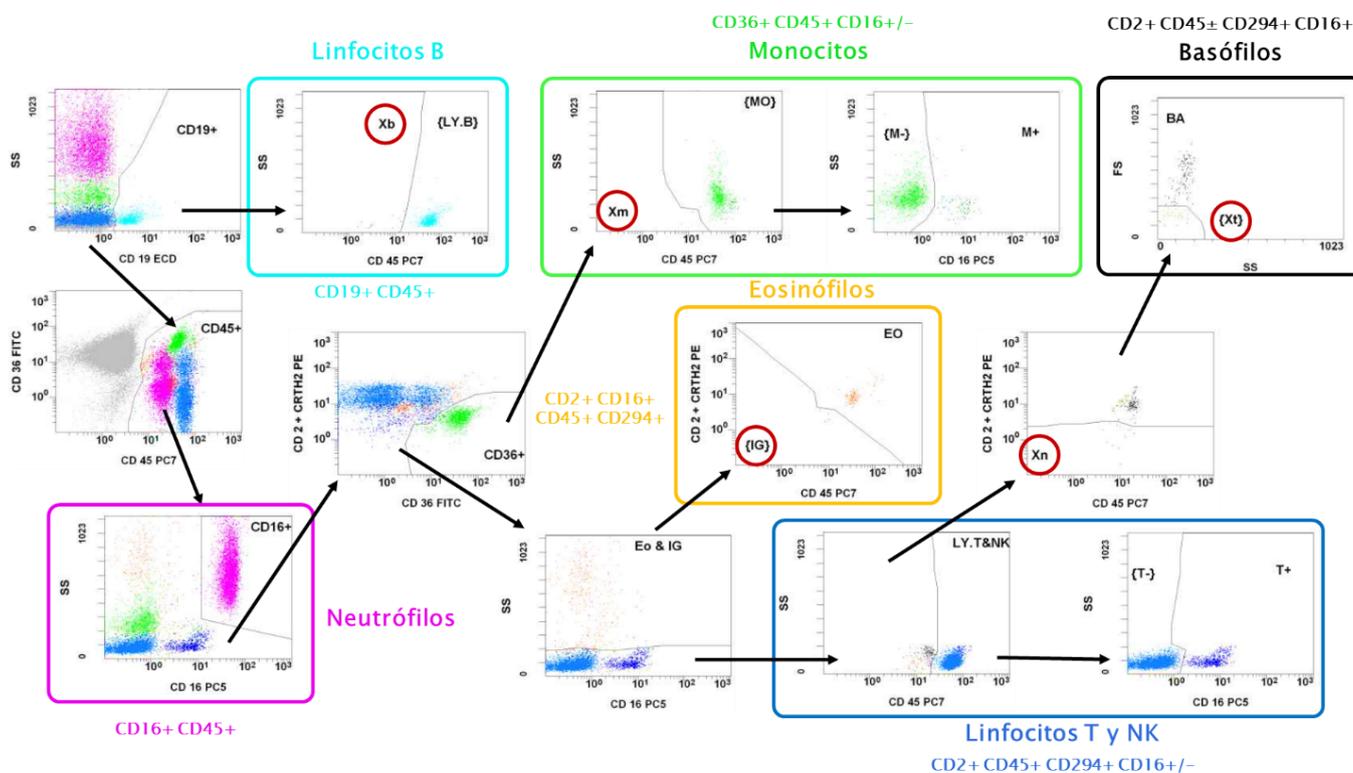


Figura 9. Separación celular por poblaciones en el *CytoDiff*. Las células se van separando en diferentes poblaciones de acuerdo con sus proteínas de membrana. Se señalan las poblaciones anormales (IG, Xb, Xm, Xt, Xn). Elaboración propia

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Serrando M, Marull A, Ruiz M, Pérez del Campo D, Puig-Pey I, Muñoz JM, et al. Clinical significance of IPF% measurement in diagnosing thrombocytopenic disorders: distinguishing primary immune thrombocytopenia from other disorders. *Int J Lab Hematol.* 2016;38:e65–e68
2. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2004;126:93–99.
3. Jones AS, Tailor H, Liesner R, Machin SJ, Briggs CJ. The value of the white precursor cell channel (*WPC*) on the Sysmex XN-1000 analyser in a specialist paediatric hospital. *J Clin Pathol.* 2015;68:161-5.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Beckmann Coulter [Internet]. Estados Unidos; 2020 [Consultado Octubre 2020]. Disponible en: <https://www.beckmancoulter.com/es?country=es>
- Calvo F, Hernando J, Marull A. Detección de Hemoglobina C Homocigota ante presencia de eritroblastos. *Laboratory Medicine at a glance* [Internet]. 2019;11:15-18. Disponible en: <https://www.labmedglance.es/images/site/Volumen11/Articulo4.pdf>
- Sánchez-Valle, ME. Hernández Navarro, F. Algoritmo diagnóstico del paciente con linfocitosis. *Medicine.* 2004; 9(21): 1365-1367
- Sysmex. Sysmex Diagnóstico Médico [Internet]. Sant Just Desvern: Sysmex; 2020 [consultado 8 octubre 2020]. Disponible en: <https://www.sysmex.es/nuestros-productos/diagnostico-medico/hematologia.html>

HEMOSTASIA EN EL LABORATORIO DE URGENCIAS: INTERPRETACIÓN DE LOS PARÁMETROS BÁSICOS

Autores: Fernando Calvo Boyero¹, Sandra Gómez Rojas²

¹Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

²Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Hemostasia, Coagulación, Urgencias

INTRODUCCIÓN

La hemostasia es el mecanismo que emplea el organismo para impedir la pérdida de sangre y mantener la circulación sanguínea tras un traumatismo o una lesión vascular. Con esta finalidad, una vez se ha producido esta lesión, intervienen cuatro sistemas: la vasoconstricción, la adhesión plaquetaria al colágeno expuesto por la lesión vascular, la formación de la red de fibrina y por último la disolución del coágulo (fibrinólisis). Durante todo este proceso se establece un equilibrio entre las acciones de las plaquetas y sus productos, los factores tisulares de la pared vascular y los factores plasmáticos para mantener la homeostasia circulatoria.

FISIOLOGÍA DE LA COAGULACIÓN

- Fases de coagulación

La formación del tapón hemostático se consigue en tres fases, de acuerdo con el modelo clásico de coagulación. Este modelo no es el actualmente aceptado, Pero en base a él se puede entender el mecanismo fisiopatológico en el que se basan las distintas pruebas de laboratorio, que se utilizan para determinar el estado de coagulación del paciente.

- Hemostasia primaria

En esta fase hay una vasoconstricción local y una adhesión plaquetaria al colágeno expuesto en la pared vascular, con la posterior agregación plaquetaria. Las plaquetas se adhieren al vaso lesionado y se agrupan formando el tapón plaquetario (Figura 1). De esta manera, se cierra la lesión de la pared y cede temporalmente la hemorragia. La adhesión plaquetaria a la pared vascular está favorecida por diversas sustancias, siendo una de ellas el factor von Willebrand (FvW).

Alteraciones en la hemostasia primaria

1. Trombocitopenia:

Disminución del número de plaquetas. Es la causa más frecuente de hemorragia por alteraciones de la hemostasia. Puede producirse por varios mecanismos:

- Descenso de la producción de plaquetas: Por patologías que afecten a la médula ósea, bien sea por infiltración tumoral, síndrome mielodisplásico o toxicidad.
- Secuestro anormal de plaquetas: Debido a hiperesplenismo. Se da generalmente en cirrosis hepática con hipertensión portal.

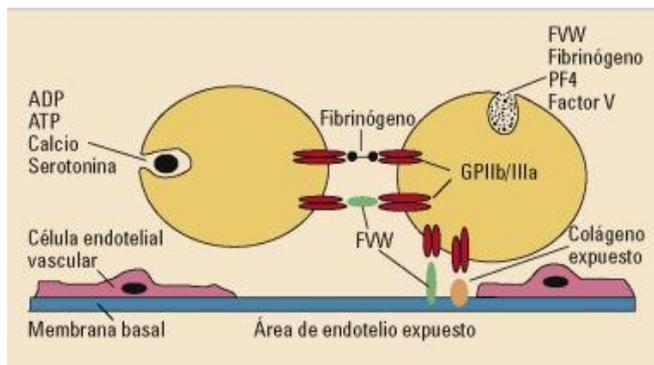


Figura 1. Mecanismo de la Hemostasia Primaria. Obtenido de: Moretó Quintana A, 2016

- Consumo de plaquetas: En lesiones tisulares extensas (grandes quemados), lesiones vasculares, vasculitis extensas y coagulación intravascular diseminada.
- Dilución de plaquetas tras transfusiones masivas.
- Destrucción de plaquetas: Por procesos inmunológicos en enfermedades autoinmunes, por presencia de anticuerpos antiplaquetarios (transfusión de plaquetas, infecciones o algunos fármacos como heparinas no fraccionadas) o en la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI). También se pueden destruir por procesos no inmunológicos como en circulación extracorpórea o síndrome hemolítico-urémico.

2. Trombopatías:

Alteración de la funcionalidad de plaquetas, como en la tromboastenia de Glanzmann o Bernard Soulier.

3. Enfermedad de Von Willebrand:

Es la alteración congénita de la coagulación más frecuente. Se produce por un déficit hereditario de factor de Von Willebrand, que promueve la fase de adhesión plaquetaria al unirse con los receptores GP Ib/IX y GP IIb/IIIa.

- Hemostasia secundaria

En esta fase se activan los diferentes factores de coagulación, de acuerdo con el modelo clásico de cascada de coagulación para dar lugar a la formación de fibrina (Figura 2). La fibrina formará una malla definitiva que reforzará al trombo plaquetario formándose un coágulo. En este proceso intervienen doce factores procoagulantes y proteínas anticoagulantes. De estas últimas, las más

importantes son la proteína C, proteína S y Antitrombina III, e impiden que se produzca una coagulación generalizada.

Existen dos vías de activación de la coagulación. La vía extrínseca comienza con una lesión vascular que expone el factor tisular al torrente circulatorio. Por otra parte, la vía intrínseca comienza al contactar superficies de carga negativa como las fibras de colágeno (presentes en el endotelio).

Alteraciones en la hemostasia secundaria

1. Hemofilia A:

Déficit de factor VIII hereditario recesivo ligado al cromosoma X, representa el 80% de los déficits congénitos de factores de la coagulación. Destaca por un alargamiento del TTPA.

2. Hemofilia B:

Déficit de factor IX hereditario recesivo ligado al cromosoma X. Clínicamente resulta indiferenciable de la hemofilia A, pero tiene distinto tratamiento. De la misma manera, se produce un alargamiento del TTPA al afectar a la vía intrínseca.

3. Déficit congénito de factores de coagulación:

Son raros, y existe uno por cada factor.

4. Déficit de vitamina K:

Se alteran los factores dependientes de esta vitamina, que se sintetizan en el hígado (II, VII, IX, X).

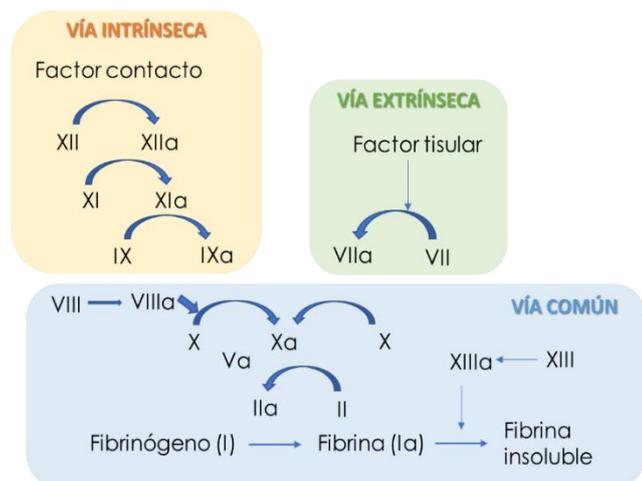


Figura 2. Cascada de coagulación. Elaboración propia

- Hemostasia terciaria

Esta fase, también conocida como fibrinólisis, tiene como fin eliminar el exceso de fibrina utilizando para ello el plasminógeno (Figura 3).

Alteraciones en la fibrinólisis

1. Alteraciones congénitas:

Los pacientes con déficit de α -2 antiplasmina o inhibidor del activador del plasminógeno presentan una fibrinólisis rápida

tras un traumatismo o una cirugía y pueden presentar hemorragias frecuentes.

2. Alteraciones adquiridas:

Los pacientes con cirrosis hepática presentan una disminución de la eliminación del activador del plasminógeno con lo que se observa un aumento de la fibrinólisis.

3. Fármacos fibrinolíticos:

Aceleran la lisis del coágulo en casos de tromboembolismo agudo (cardiaco, pulmonar, etc). El riesgo al administrar estos fármacos es la hemorragia y el efecto prolongado, que puede durar hasta 24 horas.

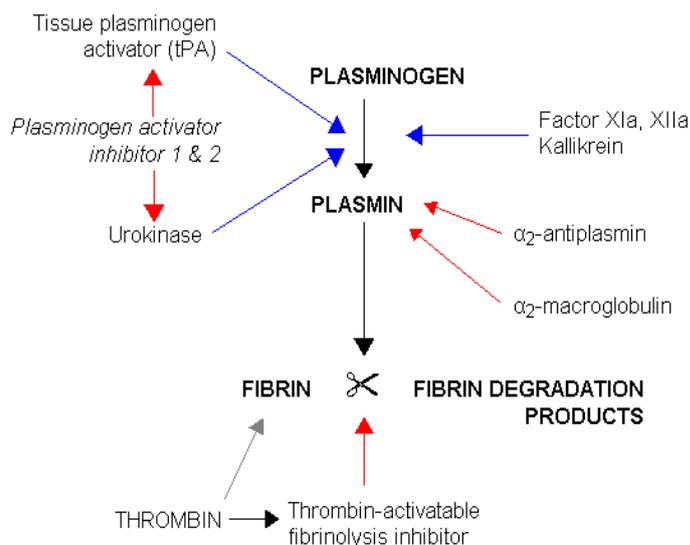


Figura 3. Mecanismo de la Fibrinólisis. Las flechas azules indican activación y las rojas inhibición. Obtenido de: <https://es.wikipedia.org/wiki/Fibrinólisis>

PARÁMETROS PARA EL ESTUDIO BÁSICO DE LA COAGULACIÓN

- Gráfica coagulométrica

Las técnicas coagulométricas de urgencia para valorar la vía intrínseca (TTPA) y extrínseca (AP, TP, INR) utilizan diferentes reactivos para formar el coágulo de fibrina en un plasma pobre en plaquetas y determinan la turbidez del plasma, que va aumentando de forma correlativa a la formación del coágulo. La curva resultante tiene tres fases: Activación de factores, polimerización (aumento de turbidez) y estabilización de fibrina. Para un análisis más exacto, se realizan la primera y la segunda derivada de la curva, que corresponden a la velocidad y aceleración de formación del coágulo, respectivamente (Figura 4).

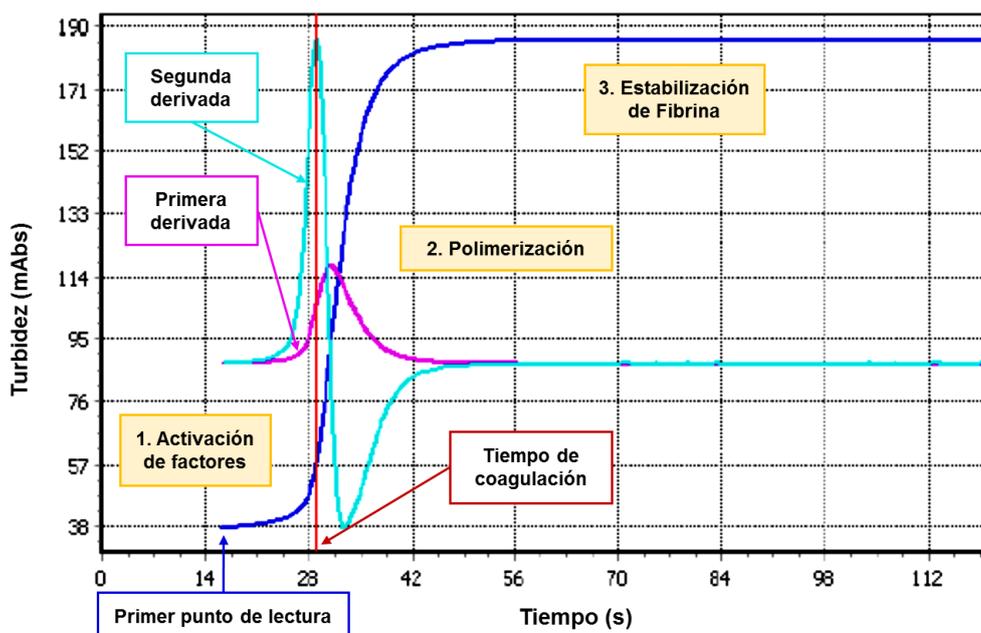


Figura 4. Gráfica coagulimétrica. Elaboración propia

- Vía intrínseca (TTPA)

El plasma del paciente se incuba con fosfolípidos y un activador con superficie de contacto cargada negativamente (sílice coloidal, caolín, ácido eláxico, etc). Tras la incubación, se añade cloruro cálcico que desencadena el proceso de coagulación, y se mide el tiempo requerido para la formación del coágulo.

Esta prueba se utiliza para la evaluación de los factores de la vía intrínseca de la coagulación y en la monitorización de la terapia con heparina. El rango normal depende de la técnica utilizada y del laboratorio. En nuestro caso es de 26-39 segundos.

Algunas causas de alteración en TTPA son las siguientes:

1. Tratamiento con heparina sódica, algunas Heparinas de bajo peso molecular (HBPM) como tinzaparina y Anticoagulantes orales de acción directa.
2. Contaminación de la muestra con heparina.
3. Déficit de Factor XII, XI, X, IX, VIII, V, II o Fibrinógeno.
4. Enfermedad de Von Willebrand
5. Enfermedades hepáticas, deficiencia de Vitamina K.
6. Anticoagulante lúpico u otros inhibidores.

Un TTPA mayor de 40 segundos debe hacer sospechar en primer lugar de que el paciente se encuentra anticoagulado o existe una contaminación por una extracción desde una vía heparinizada. Se pueden realizar las pruebas de trombina y *reptilase* para cerciorarse (ver más adelante). En caso de que la prueba de trombina sea normal, se puede realizar una prueba de mezcla, con un pool de plasma control. Si se corrige la desviación del TTPA, la causa más probable es un déficit de factores; si no se corrige, es probable que haya una

presencia de inhibidores, por lo que habrá que estudiar las causas más a fondo.

- Vía extrínseca (AP, TP, INR)

El plasma del paciente se incuba con fosfolípidos, factor tisular recombinante y cloruro cálcico, que inicia de forma inmediata la vía extrínseca de la coagulación. Esto resulta finalmente en la conversión del fibrinógeno en fibrina. El fibrinógeno se puede cuantificar de esta forma (método basado en el TP) determinando la absorbancia (altura de la curva) obtenida.

Esta prueba se utiliza para la evaluación de los factores de la vía extrínseca y común de la coagulación y en la monitorización de la terapia con anticoagulantes orales (TAO).

Los resultados de esta técnica se pueden expresar de tres formas diferentes:

- Tiempo de protrombina (TP): Segundos. Rango normal: 9.7-13.9 s.
- Actividad de protrombina (AP): Porcentaje de TP normal respecto al TP del paciente. Rango normal: 75-140 %.
- *Index Normalized Ratio* (INR): Índice internacional para estandarizar la medida de todos los pacientes anticoagulados con sintrom (acenocumarol) o aldocumar (warfarina). Rango normal: 0.85-1.2. El INR debe estar comprendido entre 2-3 en pacientes anticoagulados por fibrilación auricular, flutter auricular, trombosis, ictus; en pacientes con prótesis valvulares mecánicas debe encontrarse entre 2,5-3,5.

Algunas causas de alteración del TP son las siguientes:

- Antivitamina K: Sintrom, Aldocumar.

- Déficit de factor VII.
- Déficit de factor II, V, X: aunque suelen alterar las dos vías, primero alteran la vía extrínseca.
- Hipofibrinogenemia.
- Coagulación intravascular diseminada (CID).
- Hepatopatía.

- Fibrinógeno

Se puede determinar el conocido como Fibrinógeno derivado, que es estimado a partir del TP, o de forma directa utilizando el método de Clauss. El rango de normalidad se encuentra entre 200-450 mg/dL.

El Fibrinógeno derivado se utiliza como prueba de screening, y es válido para valores entre 200-700 mg/dL. En pacientes con TAO, CID, hepatopatías, fallo renal o disfibrinogenemia pueden dar un valor mucho más elevado que el Clauss.

El Fibrinógeno Clauss determina el tiempo que tarda en formarse el coágulo al añadir trombina en exceso al plasma del paciente. Esta determinación se realiza habitualmente ante valores <200 mg/dL de Fibrinógeno derivado.

El Fibrinógeno es un reactante de fase aguda, que además se puede elevar ante el embarazo o la toma de anticonceptivos orales o el ejercicio agudo. La disminución de fibrinógeno puede deberse a un déficit de éste (afibrinogenemia, hipofibrinogenemia), enfermedad hepática, hepatitis virales o Coagulación Intravascular Diseminada (CID). Ante un valor <100 mg/dL, constituye un valor crítico y hay que aportar tratamiento sustitutivo por el alto riesgo de sangrado.

- Fibrinolisis (Dímero D)

El Dímero D es un dominio antigénico de los productos de degradación de la fibrina liberados durante la fibrinólisis por acción de la plasmina. Este dominio no se encuentra en el fibrinógeno ni en la fibrina soluble, por lo que es específico de estos productos de degradación de la fibrina. Los Dímeros D se determinan por un método inmunoturbidimétrico, con un anticuerpo específico para el dominio D-Dímero. Esta determinación se utiliza principalmente para diagnóstico de la trombosis y la monitorización de la terapia trombolítica.

Se encuentran niveles elevados de Dímeros D (>500 ng/mL) en trombosis venosa profunda (TVP), tromboembolismo pulmonar (TEP) y coagulación intravascular diseminada (CID), donde presentan un alto valor predictivo negativo. También se encuentran elevados durante el embarazo, aunque los niveles elevados se asocian con complicaciones. Otras situaciones en las que se encuentran elevados son el Infarto Agudo de Miocardio, neumonías, neoplasias, hepatopatías, traumatismos y COVID-19.

OTROS PARÁMETROS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE LA COAGULACIÓN DE URGENCIA

- Anti Xa

Se utiliza un ensayo cromogénico para determinar la cantidad de factor antiactivado X, que correlaciona con la actividad heparina de bajo peso molecular (HBPM), por lo que se utiliza para la monitorización del tratamiento. Se suele utilizar únicamente en pacientes con posibles alteraciones farmacocinéticas, como pacientes obesos, de bajo peso, gestantes o con insuficiencia renal. El rango terapéutico se encuentra entre 0,6-1,2 U/mL, y el rango profiláctico entre 0,2-0,6 U/mL.

- Tiempo de Trombina (TT) y Tiempo de Reptilase (TR)

En el test de Tiempo de Trombina, el Fibrinógeno del plasma del paciente se transforma en Fibrina tras añadir trombina, midiendo el tiempo requerido para la formación del coágulo.

En la prueba de Tiempo de Reptilase, se utiliza Batroxobina o Reptilasa, un compuesto procedente del veneno de la serpiente de barba amarilla (*Bothrops atrox*) que funciona de manera similar a la trombina, con la diferencia de que no se ve inhibida por la heparina.

Estas pruebas se utilizan principalmente para asegurar o descartar una anticoagulación con heparina ante un TTPA alargado. En primer lugar, se realiza una prueba de trombina, que si fuera alargado (Figura 5) se realizaría un test de reptilase. En caso de ser normal, se puede asegurar que existe una anticoagulación con heparina. En caso de ser también elevado, se debería pensar en una alteración del fibrinógeno o una hepatopatía.

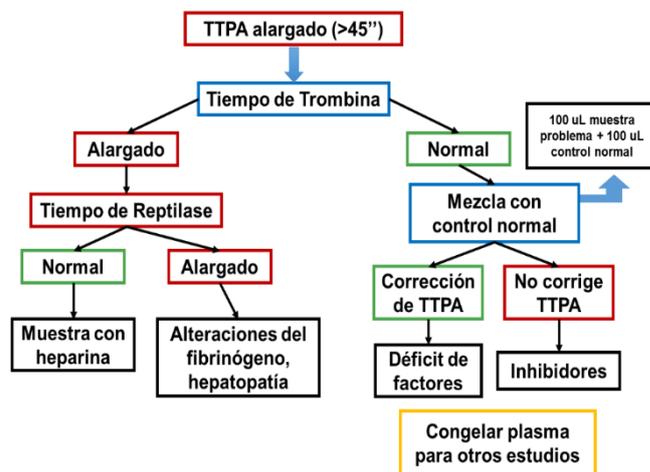


Figura 5. Algoritmo de actuación ante un TTPA alargado.
Elaboración propia

- Test de la Función Plaquetaria (PFA-100)

En esta prueba se hace pasar la sangre total anticoagulada con citrato del paciente a través de dos membranas porosas en las que en una hay colágeno con epinefrina, y en la otra, colágeno con ADP. Al pasar las plaquetas por estas

membranas, se agregan, determinando el tiempo que tarda en obtenerse la membrana. El alargamiento de estos tiempos de obturación indica diferentes causas patológicas (Tabla 1).

		Colágeno/Epinefrina
Colágeno/ADP	Normal	Prolongado (>160s)
Normal		AINE
Prolongado (>125s)	Inhibidores de ADP plaquetarios Enfermedad de von Willebrand	Uremia Trombopatías

Tabla 1. Interpretación de resultados de la prueba PFA-100. Adaptado de: González Hernández A, 2014.

INTERFERENCIAS EN LA MEDICIÓN

Es importante mantener una proporción constante entre el plasma y el anticoagulante. Esto generalmente se cumple para pacientes con un hematocrito normal. Sin embargo, en pacientes con un hematocrito superior a 55% (o inferior a 28%) es necesario corregir la cantidad de anticoagulante utilizado, ya que a hematocritos elevados el volumen plasmático es menor y se obtendrían tiempos falsamente alargados por el exceso de anticoagulante.

A la hora de la extracción es importante rellenar correctamente el tubo (hasta la línea de enrase) con sangre del paciente. Si se extrae un volumen menor, existirá más concentración de anticoagulante y por tanto se prolongarán los tiempos de coagulación. Por otra parte, en el caso de emplear tubos de vacío, no debe extraerse antes del tubo de coagulación un tubo con otro anticoagulante o con aerosoles que activen la coagulación. En caso de extraer el tubo de una vía, es importante descartar que haya podido contaminarse con heparina o pueda estar diluida con suero fisiológico.

Al emplear la turbidimetría para la determinación del coágulo, el plasma debe permitir el paso de luz. Si la muestra está lipémica, icterica o hemolizada es posible que interfiera por una absorción de luz que proporciona unos resultados alterados.

EFFECTO DE LOS ANTICOAGULANTES EN LAS TÉCNICAS DE COAGULACIÓN

- Heparinas no fraccionadas (HNF)

Estos fármacos estimulan la acción de la antitrombina III, lo que aumenta su capacidad de inactivar la vía común (trombina y factor Xa) y la vía intrínseca (factores XIIa, XIa y IXa).

Alteran el TTPA, lo que se utiliza para monitorizar su acción, y si existe una sobredosificación pueden alterar el TP por la inactivación de la vía común.

- Heparinas de bajo peso molecular (HBPM)

Las heparinas de bajo peso molecular (Enoxaparina, Bemiparina, Fraxiparina, Nadroparina, Tinzaparina) realizan su acción mediante un mecanismo similar a la HNF pero inhibiendo de forma mucho más significativa el factor Xa que el factor IIa. De esta manera, a concentraciones normales no afecta ni al TP ni al TTPA y se monitorizan mediante la actividad anti-Xa.

- Antivitamina K (ACK)

El acenocumarol y la Warfarina impiden la formación hepática de los factores II, VII, IX y X, por lo que afectan a la vía común y la vía extrínseca. De esta manera, alteran principalmente el TP, AP y INR (este último se utiliza para su monitorización).

- Anticoagulantes orales de acción directa (ACOD)

Estos anticoagulantes tienen dos vías de acción. Por un lado, está el Dabigatrán, que es un inhibidor de la trombina y altera principalmente el TTPA y en algunos casos el TP. Por otra parte, el Tiempo de Trombina es muy sensible a las concentraciones de este fármaco.

Por otro lado, están los inhibidores del factor Xa (Rivaroxabán y Apixabán), que alteran el TP, en menor medida el TTPA y no alteran el Tiempo de Trombina. La actividad anti-Xa es muy sensible a la concentración de estos fármacos.

Sin embargo, aún no existen pruebas estandarizadas que se correlacionen con el efecto anticoagulante de estos fármacos y permitan su monitorización en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Aulesa C, Ruiz G, Durán J, Galimany R. Estudio de la influencia de la hemólisis en un perfil básico de coagulación. Rev Diagn Biol. 2002;51(2): Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732002000200003.
- Dalmau A. Fisiología de la hemostasia [Internet]. 2005 [acceso 10 octubre 2020]. Disponible en: URL disponible en: http://www.scard.org/arxiu/hemostasia_05.pdf
- Fibrinólisis [Internet]. Wikipedia; 2020. [acceso 11 octubre 2020]. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Fibrinólisis>
- González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 2ª ed. Barcelona: Elsevier España; 2014.
- Moretó Quintana A, Sierra Aisa C, Iruin Irulegui G, Martín Martitegui X, García-Ruiz JC. Enfermedades de la hemostasia primaria. Púrpuras vasculares. Enfermedades de las plaquetas. Medicine. 2016;12(22):1267-74.
- Ruiz-de-Chávez-Ochoa AA, Núñez-Pérez E, Muñoz-Muñoz B, Majluf-Cruz A. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2008;46(3):339-348. Disponible en:

<https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2008/im083p.pdf>

- Torrent Español M, Badell Serra I. Interpretación del hemograma y de las pruebas de coagulación. En: AEPap ed. Curso de Actualización Pediatría 2012. Madrid: Exlibris Ediciones; 2012. p. 203-16.
- Zehnder JL. Clinical use of coagulation tests [Internet]. Waltham, MA.: UpToDate; 2020 [acceso 8 octubre 2020]. Disponible en: <http://www.uptodate.com>.

ARTRITIS SÉPTICA

Autores: Olga Nerea Coya Linares¹, Carmen Alhena Reyes Ruiz²

¹Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Artritis séptica, Infección articular

INTRODUCCIÓN

La artritis séptica es la reacción inflamatoria que se produce como consecuencia de la infección de la cavidad articular por microorganismos que potencialmente pueden provocar la destrucción de la/s articulación/es. En la mayoría de casos el agente causal de la infección es bacteriano, aunque con menor frecuencia otros microorganismos también pueden estar implicados. Se considera que la artritis séptica es una verdadera urgencia médica ya que se trata de una enfermedad infecciosa con importante morbilidad y mortalidad.

La artritis séptica se diferencia de la artritis reactiva porque en esta última nos encontramos ante un proceso inflamatorio estéril.

Generalmente se trata de un proceso monoarticular (monoartritis), aunque también se puede ver involucrada más de una articulación (oligoartritis si son 2 ó 3 o poliartritis si son más de 3). Algunos factores que pueden predisponer a la afectación poliarticular pueden ser la artritis reumatoide, otras enfermedades del tejido conectivo, la inmunosupresión o la sepsis. Las articulaciones más frecuentemente afectadas son la rodilla y la cadera, el resto de articulaciones se ven afectadas en menos del 10% de los casos.

Se estima que el número de casos es de 7-8 por 100.000 personas-año. La incidencia ha ido aumentando a lo largo de los años debido al envejecimiento de la población, aumento de las resistencias y las terapias inmunosupresoras.

FISIOPATOLOGÍA

La artritis séptica comienza cuando el microorganismo con potencial patógeno alcanza el espacio sinovial, donde prolifera y desencadena el proceso inflamatorio.

Existen tres posibles vías de acceso:

- La vía hematógena, la más común. El microorganismo accede a través de la sangre desde un foco de infección/colonización lejano.
- Por contigüidad, por ejemplo por la infección de un hueso cercano.
- Por inoculación directa, la menos común. Se puede producir por un proceso invasivo articular como, por ejemplo, una herida traumática o una cirugía.

PATOGÉNESIS

La artritis séptica cursa con dolor, hinchazón, calor, restricción del movimiento en la/s articulación/es afectada/s y fiebre en la mayoría de los casos.

La patogénesis se debe a la invasión bacteriana que desencadena una respuesta inflamatoria aguda e isquemia tisular. Como consecuencia se produce una respuesta inflamatoria con liberación de citoquinas, proteasas y otros productos inflamatorios por parte de las células que dan origen al exudado purulento, además de a la degradación e inhibición de la síntesis del cartilago (hidrolizan el colágeno y proteoglicanos) y pueden llevar a la destrucción irreversible del hueso.

Así mismo se produce un aumento de presión y disminución del flujo sanguíneo lo que tiene como consecuencia la anoxia.

A esta respuesta inflamatoria se unen las propiedades patogénicas características del microorganismo invasor, existiendo diferentes grados de virulencia. Los retrasos en el diagnóstico y tratamiento del paciente pueden llevar a una lesión irreversible en la articulación.

Existen diversos factores como la estabilidad de la cápsula sinovial, el estado de inmunosupresión del paciente o la virulencia del agente patógeno que pueden desencadenar en un empeoramiento pronóstico y derivar en un estado séptico. La infección puede evolucionar a bacteriemia e incluso a la muerte del paciente.

FACTORES DE RIESGO

Existen muchos factores que predisponen a sufrir artritis séptica, algunos de ellos se muestran en la Figura 1.



Figura 1. Principales factores de riesgo que predisponen a sufrir artritis séptica. Elaboración propia

En cuanto a la edad, los pacientes con un mayor riesgo de sufrir artritis séptica son los mayores de 65 años y los niños. También tienen más riesgo aquellos pacientes que han sido sometidos a cirugías articulares, pacientes que tienen prótesis, los adictos a drogas por vía parenteral (ADVP), pacientes con diabetes mellitus, artritis reumatoide u otra patología articular crónica de base. La endocarditis

infecciosa también se considera un factor que predispone a la poliartritis séptica bacteriana.

ETIOLOGÍA

Los microorganismos que más comúnmente causan artritis séptica varían con la edad y características de los pacientes (Figura 2).

- *Staphylococcus aureus*

Es el principal agente etiológico independientemente de la edad o comorbilidad. Este patógeno es propenso a adherirse a los tejidos sinoviales. Las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) han aumentado en los últimos años.

- *Streptococcus spp.*

Estreptococos β -hemolíticos del grupo A (*S. pyogenes*), grupo B (*S. agalactiae*) o C, G o S. También estreptococos α -hemolíticos del grupo "viridans" y *Streptococcus pneumoniae* (neumococo). Es el segundo grupo de microorganismos más frecuente independientemente de la edad. La artritis neumocócica ha disminuido notablemente su prevalencia gracias a la vacunación y es más común en pacientes con anemia drepanocítica, mieloma múltiple o disfunción esplénica.

- Bacilos Gram-negativos

Los más comunes son los *Enterobacterales* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se asocia generalmente a pacientes ADVP, de avanzada edad o inmunodeprimidos. También se asocia a focos infecciosos extraarticulares (ej. infección urinaria).

La prevalencia de la artritis por *Haemophilus influenzae* tipo b ha disminuido considerablemente gracias a la vacunación, por eso es más frecuente en niños menores de 5 años no vacunados.

Kingella kingae coloniza la orofaringe de niños menores de 5 años y es una importante causa de infección osteo-articular infantil por diseminación sistémica. Es una bacteria de difícil aislamiento en cultivo por lo que cada vez es más frecuente el diagnóstico por PCR a tiempo real.

Otros bacilos Gram negativos de la microbiota oral como *Fusobacterium* o *Prevotella* pueden causar infección en caso de traumatismo articular abierto o en pacientes ADVP. En este caso podría ocurrir una infección polimicrobiana de la articulación.

- *Neisseria gonorrhoeae* (gonococo).

Causa más común de artritis séptica en adultos jóvenes sexualmente activos aunque ha ido disminuyendo su prevalencia. Suele cursar con poliartralgias, tenosinovitis y exantema.

- Otras etiologías menos frecuentes

Mycobacterium tuberculosis, otras micobacterias no tuberculosas y hongos (*Candida*, *Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Sporothrix*, *Aspergillus*) o *Mycoplasma hominis* en ocasiones son agentes causales en pacientes inmunocomprometidos.

Algunos virus (virus Chikungunya, dengue, zika, parvovirus, sarampión, rubeola, etc) también pueden producir poliartritis por depósito de inmunocomplejos.

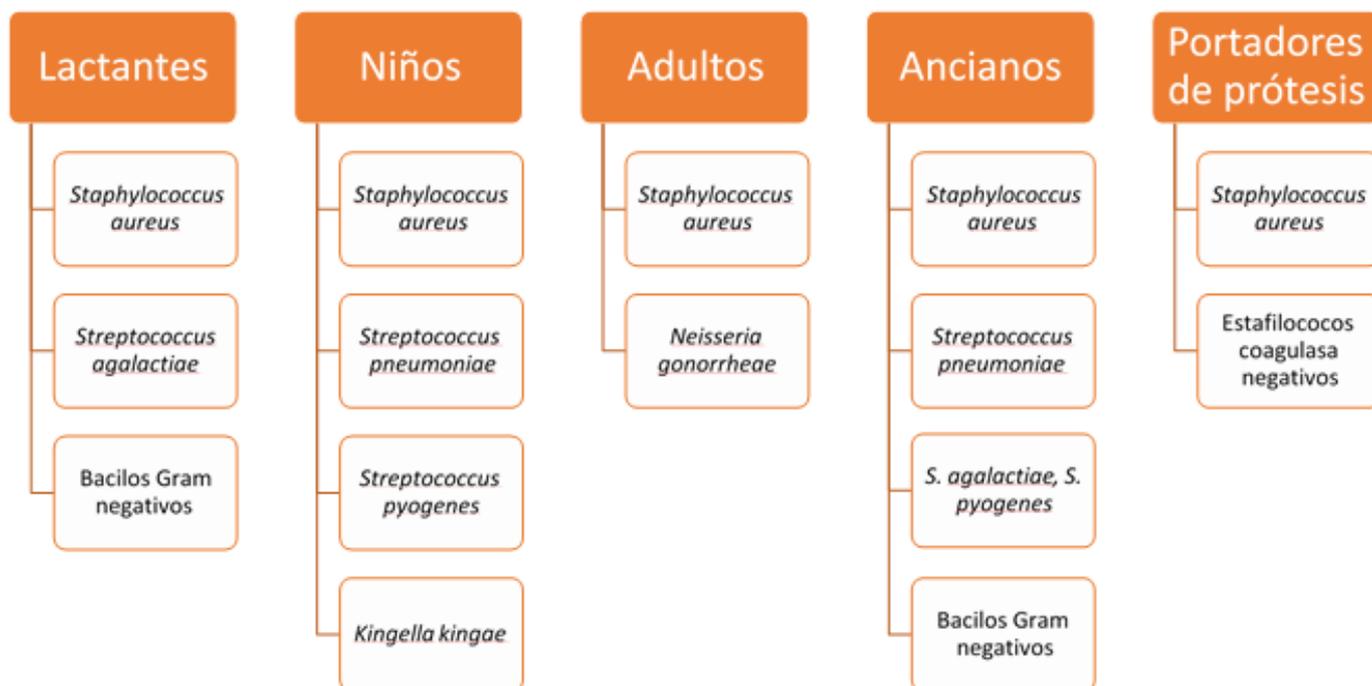


Figura 2. Agentes causales más comunes según edad y características del paciente. Elaboración propia.

DIAGNÓSTICO

Para el correcto diagnóstico es fundamental:

- Recabar una historia minuciosa del paciente.
- Realizar un examen de la articulación tanto con pruebas de imagen como visualmente.
- Establecer la presencia o ausencia de derrame.
- Realizar un estudio de sangre periférica.
- Estudiar el líquido sinovial.
- Extracción de hemocultivos.

La triada clásica que nos vamos a encontrar en los pacientes con artritis séptica es:

- Fiebre (aunque no todos los pacientes van a tener fiebre y en muchas ocasiones va a ser fiebre baja habrá pacientes que rondan los 40 grados).
- Dolor hasta en el 75% de los pacientes.
- Restricción del movimiento en la articulación afectada.

- Exploración física y pruebas de imagen

A la exploración física veremos tumefacción franca, eritema calor e inflamación. Estos síntomas serán menos evidentes en articulaciones profundas y en pacientes de edad avanzada, inmunosuprimidos o adictos a drogas por vía parenteral.

Entre las pruebas de imagen que nos pueden ayudar a orientar el diagnóstico se encuentran:

- Radiografía: Podremos observar si existe un aumento del espacio articular.
- Ecografía: Permite la detección del derrame pero no aporta información sobre un origen infeccioso o no.
- Resonancia magnética: Mejora la diferenciación entre infección ósea y de partes blandas.
- Gammagrafía ósea: Permite detectar inflamación.

- Estudio bioquímico

Habrá que prestar especial atención a los reactantes de fase aguda. Normalmente nos encontraremos con una Velocidad de Sedimentación Globular (VSG), Proteína C Reactiva (PCR) y leucocitos elevados. Estos parámetros no son diagnósticos pero conviene tenerlos en cuenta sobre todo para ver la respuesta al tratamiento. Nos servirán para realizar monitorización.

- Estudio líquido sinovial

El líquido sinovial se obtendrá por artrocentesis diagnóstica y se realizará tanto estudio bioquímico como citológico, microbiológico y de cristales.

- Estudio bioquímico

Típicamente nos encontraremos con niveles de glucosa inferiores a 40-50 mg/dl (Valores normales 80-100 mg/dl). Estos

niveles orientan hacia la presencia de bacterias en el líquido.

Los niveles de proteínas estarán aumentados, normalmente $>4.4\text{g/dl}$, cuando los niveles normales son $<2\text{ g/dl}$. Esto es indicativo de la proliferación de sustancias de desecho probablemente relacionadas con la actividad bactericida de los neutrófilos.

- Estudio de cristales

Se buscarán cristales mediante microscopía de luz polarizada que nos podría orientar hacia otros diagnósticos pero no descartaría del todo la artritis séptica.

- Estudio citológico

En condiciones normales, el líquido sinovial es transparente, con una elevada viscosidad, $<200\text{ leucocitos/mm}^3$, un porcentaje de polimorfonucleados inferior al 25% y presenta un cultivo estéril.

Cuando existe infección del líquido sinovial sus características cambian, típicamente nos encontraremos ante un líquido opaco, amarillo/lechoso, $>20.000\text{ leucocitos/mm}^3$ (no existe un punto de corte específico), $>75\%$ de polimorfonucleados y un cultivo positivo.

- Estudio microbiológico

Se realizará una tinción de Gram y cultivo por siembra en placas o por inoculación en frasco de cultivo (aerobio y anaerobio) del líquido sinovial extraído.

La tinción de Gram, aún con sus limitaciones de interpretación y sensibilidad, nos permitirá realizar una revisión microscópica precoz para ajustar la terapia antibiótica en caso de observación de células inflamatorias y microorganismos.

La obtención de un cultivo negativo no permite descartar artritis séptica, por ejemplo en el caso de infecciones por *Kingella kingae*, *Neisseria gonorrhoeae* o tratamiento antibiótico previo a la obtención de la muestra. La PCR a tiempo real en la muestra clínica es una técnica molecular diagnóstica en el caso de sospecha de infección elevada con cultivos negativos.

- Hemocultivos

El estudio de los hemocultivos es muy importante ya que hasta 1/3 de los pacientes desarrolla bacteriemia y, en ocasiones, los hemocultivos son la única forma de establecer un diagnóstico microbiológico definitivo.

- Otros

Además de los estudios habitualmente realizados, ante la sospecha de artritis séptica, hay otras pruebas que se puede realizar para ayudar a orientar el diagnóstico:

- Procalcitonina: Los niveles de procalcitonina en suero nos pueden ayudar a diferenciar entre artritis séptica o no séptica.
- Lactato en líquido sinovial
- Reacción en cadena de la polimerasa en líquido sinovial
- Prepepsina: se genera por la descomposición del CD14 que se produce cuando las bacterias son fagocitadas por los monocitos. Los niveles de prepepsina se elevan cuando hay sepsis pero no cuando hay respuesta inflamatoria en ausencia de infección. Los niveles de prepepsina en líquido sinovial (también en suero) pueden ayudar a establecer un diagnóstico temprano.

TRATAMIENTO

El tratamiento de la artritis séptica incluye el drenaje de la articulación y la implantación de tratamiento antibiótico.

- Drenaje de la articulación

Una de las primeras acciones a realizar es la evacuación del contenido articular infectado, se debe realizar para descomprimir la zona, mejorar el flujo sanguíneo y eliminar las toxinas y proteasas.

Hay varias formas de realizar la evacuación:

- Artrocentesis
- Artroscopia
- Artrotomía

Para la recuperación de la articulación habrá que pasar de la inmovilización (en una posición funcional) a una fase de movilización pasiva y finalmente a una movilización activa.

- Tratamiento antibiótico

Ante la sospecha de artritis séptica se debe establecer antibioterapia empírica hasta obtener la confirmación del diagnóstico (Tabla 1).

Para establecer el tratamiento, en ausencia de diagnóstico definitivo, deberemos tener en cuenta la historia y características del paciente, los síntomas y los resultados de la tinción de gram. Con estos datos habrá que establecer el/los agentes causales más probables y pautar un tratamiento antibiótico que cubra frente a estos microorganismos.

Tras la confirmación del diagnóstico se podrá modificar el tratamiento para seleccionar aquellos antibióticos que sean más eficaces contra la bacteria causante de la artritis séptica.

CASO CLÍNICO

Varón de 66 años natural de Ecuador con antecedentes de mieloma múltiple quiescente IgG kappa de alto riesgo que

mantiene tratamiento con prednisona en dosis descendente, hipertensión arterial y cardiomiopatía isquémica crónica. El paciente acude al Servicio de Urgencias por dolor intenso e impotencia funcional en hombro derecho con claro empeoramiento en la semana previa. Niega traumatismos y sobreesfuerzos a ese nivel.

No presenta fiebre ni tiritona. A la exploración, presenta mal estado general, palidez cutánea, diaforesis y taquicardia. Destaca un importante derrame articular y tumefacción de la articulación glenohumeral, con impotencia funcional total y gran dolor a la movilización. La analítica sanguínea muestra marcada elevación de PCR (20.95 mg/dl). Se realiza ecografía articular del hombro derecho que muestra abundante líquido en la bursa subacromio-subdeltoidea, con contenido ecogénico, compatible con bursitis (Figura 3).

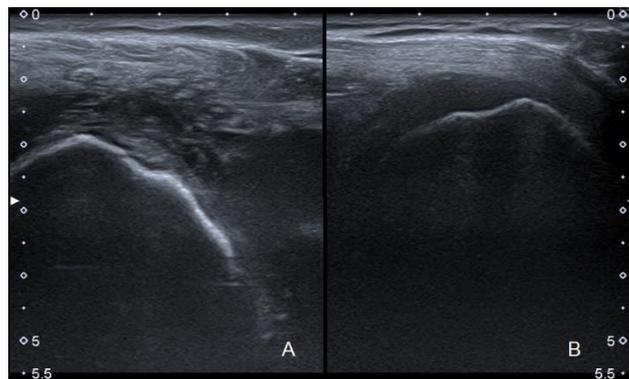


Figura 3. Acumulación de líquido en la articulación glenohumeral del hombro derecho (A) e izquierdo sin afectación (B). Elaboración propia

Teniendo en cuenta los datos de los que se dispone hasta este momento se establece la sospecha de artritis séptica por lo que se decide realizar una artrocentesis diagnóstica mediante la cual se extraen 26mL de pus franco y establecer tratamiento con ceftriaxona y cloxacina.

El pus extraído se envía al Laboratorio de Microbiología y se le realiza un gram urgente en el que se observan cocos gram positivos en cadenas con predominio de diplococos y células inflamatorias (Figura 4).

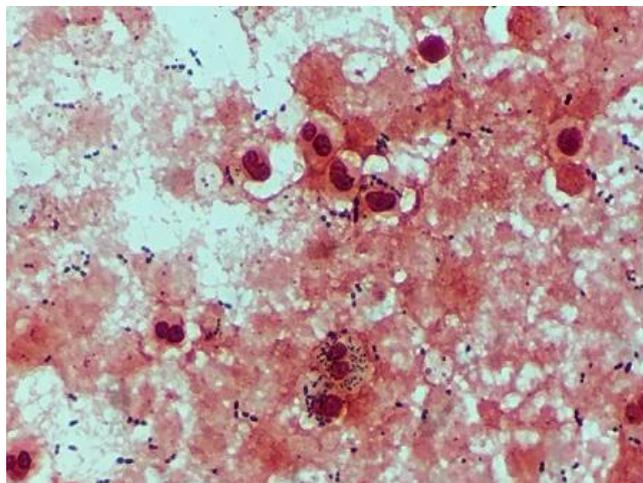


Figura 4. Tinción de gran del material purulento extraído por artrocentesis. Elaboración propia

Tras el gram la sospecha es de artritis séptica estreptocócica y, aunque se puede retirar la cloxacina, se decide mantener el tratamiento antibiótico sin cambios hasta tener un diagnóstico definitivo y se realiza un desbridamiento por artroscopia y colocación de drenajes.

Pasadas 24h de la incubación crecen en agar sangre y chocolate unas colonias pequeñas alfa-hemolíticas que se identifican, utilizando MALDI-TOF (*Bruker Daltonics*, Alemania), como *Streptococcus pneumoniae* con un score 2,03. Tras la identificación se procede a desescalar el tratamiento antibiótico a monoterapia con ceftriaxona. El antibiograma realizado por E-test revela sensibilidad a penicilina (CMI <0.016 mg/dL), cefotaxima (CMI 0.012 mg/dL) y levofloxacin (CMI 0.75mg/dL) según criterios de EUCAST.

La cepa se remite al Laboratorio Regional de Salud Pública de la Comunidad de Madrid, donde se clasifica como *Streptococcus pneumoniae* serotipo 15B (esta cepa se encuentra en el 1.6% de los casos). Se procede a revisar los antecedentes vacunales del paciente, comprobándose que recibió una dosis de vacuna conjugada (VNC13) en 2010 y otra en 2016 pero nunca la VNP23 que protege frente al serotipo 15B.

Siete días después del ingreso, habiéndose retirado los drenajes y manteniendo el paciente un excelente estado general y sin dolor a nivel articular, se procede al alta domiciliaria pautando amoxicilina vía oral 1 gr/8h durante 3 semanas. El diagnóstico final fue de artritis séptica por *S.*

pneumoniae en paciente con antecedente de mieloma múltiple en tratamiento con corticoides.

Tras seis meses se le considera curado de la infección presentando como secuela impotencia funcional parcial en la articulación

CONCLUSIONES

En las artritis neumocócicas hasta un 36% de los pacientes tienen afectación poliarticular, en contraste, nuestro paciente tiene una monoartritis.

El 6% de las artritis sépticas son debidas a *S. pneumoniae* y de éstas un 6% se dan en pacientes con mieloma múltiple. Los pacientes con mieloma múltiple están inmunocomprometidos y tienen más riesgo de sufrir infecciones por bacterias encapsuladas.

La implantación de un tratamiento antibiótico temprano es crucial en los pacientes con artritis séptica.

Existe un elevado porcentaje de pacientes que sufren pérdida irreversible de la funcionalidad de la articulación, como es el caso de nuestro paciente.

Pacientes	Sin aislamiento bacteriano	Cocos Gram positivos	Cocos Gram negativos (gonococo)	Bacilos Gram negativos
Niños <5 años	Amoxi-clavulánico o cefuroxima/cefalosporina de 3ª generación	Amoxi-clavulánico o cefuroxima/cefalosporina de 3ª generación Cloxacilina (si cocos en racimos)	Cefalosporina 3ª generación (ceftriaxona o cefotaxima)	Cefuroxima/cefalosporina 3ª generación o amoxi-clavulánico
Niño mayor Adolescentes Adultos jóvenes	Cloxacina con o sin cefalosporina de 3ª generación o amoxi-clavulánico	Cloxacilina o amoxi-clavulánico o cefuroxima	IDEM	---
ADPV	Cloxacina + gentamicina	IDEM	IDEM	Ceftazidima o aztreonam
Edad > 65 años Inmunodeprimidos	Amoxi-clavulánico ± gentamicina o cloxacina más cefalosporina de 3ª generación	Amoxi-clavulánico o cloxacilina y/o cefalosporina 3ª generación	IDEM	Cefalosporina 3ª/4ª generación o aztreonam/piperacilina-tazobactam/carbapenémicos

Tabla 1. Sospecha clínica de artritis séptica: antibioterapia empírica urgente en base a la tinción de Gram del líquido articular y las características del huésped. Adaptada de:

www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosclinicos/seimc-procedimientoclinicovi.pdf

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Belkhir L, Rodriguez-Villalobos H, Vandercam B, Marot JC, Cornu O, Lambert M, Yombi JC. Pneumococcal Septic Arthritis in Adults: Clinical Analysis and Review. *Acta Clin Belg.* 2014;69(1):40–6.
- Bolaños Solís, MF. Artritis Séptica. *Rev Med Sinergia.* 2013;2(1):22–5.
- Carpenter CR, Schuur JD, Everett WW, Pines JM. Evidence-based Diagnostics: Adult Septic Arthritis. *Acad Emerg Med.* 2010;18(8):781–96.
- De Oliveira Pinto AP, Mendes da Silva B, Da Costa Beber Scarton, AL, Ghizoni Schmoeller D, Staub HL. Pneumococcal arthroentesis and multiple myeloma. *Rheumatol Int.* 2014;35(2):373–4.
- Dernoncourt A, El Samad Y, Schmidt J, Emond JP, Gouraud C, Brocard A, El Hamri M, Plassart C, Rousseau F, Salle V, Diouf M, Varon E, Hamdad F. Case studies and literature review of pneumococcal septic arthritis in adults. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(10):1824–33.
- García-Arias M, Balsa A, Mola EM. Septic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2011;25(3):407-21.
- Gómez González del Tánago P, Navarro Vidal B, Panadero del Olmo L, Panadero Carlavilla FJ. Artritis séptica. *Panor Actual Med.* 2013;37(363):377-83.
- González-Romo F, Picazo JJ, García Rojas A, Labrador Horrillo M, Barrios V, Magro MC et al. Consenso Sobre La Vacunación Anti-Neumocócica En El Adulto Con Patología de Base. *Rev Esp Quimioter.* 2013;26(3):232–52.
- Guillen-Astete CA, Grandal Platero M, Velazquez Arce C, Maldonado Romero VL, Vázquez Díaz M. Guía de manejo diagnóstico y terapéutico de la artritis séptica en urgencias. *Arch Med.* 2013;9(2):1-10.
- Hassan AS, Rao A, Manadan AM, Block JA. Peripheral bacterial septic arthritis: Review of diagnosis and management. *J Clin Rheumatol.* 2017;23(8):435–42.
- Hernández Cuellar MV, Torres Lima AM, Hernández Cuellar IM. Actualizaciones en la etiopatogenia de la artritis séptica. *Rev Cuba Reumatol.* 2012;14(19):43–50.
- Imagama T, Tokushige A, Seki K, Seki Toshihiro, Nakashima D, Ogasa H, Sakai T, Taguchi T. Early diagnosis of septic arthritis using synovial fluid presepsin: A preliminary study. *J Infect Chemother.* 2019;25(3):170-74.
- Lenski M, Scherer MA. Analysis of synovial inflammatory markers to differ infectious from gouty arthritis. *Clin Biochem.* 2013;47:49-55.
- Li SF, Henderson J, Dickman E, Darzynkiewicz R. Laboratory Tests in Adults with Monoarticular Arthritis: Can they rule out a septic joint? *Acad Emerg Med.* 2004;11(3):276-80.
- Markus L, Scherer MA. Analysis of synovial inflammatory markers to differ infectious from gouty arthritis. *Clin Biochem.* 2014;47(1-2):49-55.
- Martínez-Castillo A, Núñez C, Cabiedes J. Análisis de líquido sinovial. *Reumatol Clin.* 2010;6(6):316–21.
- Mathews C J, Coakley G. Septic arthritis: Current diagnostic and therapeutic algorithm. *Curr Opin Rheumatol.* 2008;20(4):457–62.
- Meléndez Carmona MA, Reyes Ruiz C, Sánchez JM, Sanz JC, Ramos B, Chaves F, Orellana Miguel MA. ECCMID 2018. P0597 Impact of invasive pneumococcal disease in a southern area of Madrid after the implementation of pneumococcal vaccination. 2016. 597.
- Morgenstern C, Renz N, Cabric S, Perka C, Trampuz A. Multiplex PCR and Microcalorimetry in Synovial Fluid: Can Pathogen-based Detection Assays Improve the Diagnosis of Septic Arthritis? *J Rheumatol.* 2018;45(11):1588-93.
- Ross JJ. Septic Arthritis of Native Joints. *Infect Dis Clin N Am.* 2017;31:203–18.
- Sumrall A, Muzny C, Bell J, Dreiling B. Pneumococcal septic arthritis as the initial presentation of multiple myeloma. *Int J Lab Hem.* 2008;30:82-3.
- Zhao J, Zhang S, Zhang L, Dong X, Li J, Wang Y, Yao Y. Serum procalcitonin levels as a diagnostic marker for septic arthritis: A meta-analysis. *Am J Emerg Med.* 2017;35(8):1166–71.

LA ENFERMEDAD CELIACA

Autor: David Cuevas Gómez

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Palabras clave: Enfermedad celiaca, Gluten, Diagnóstico

DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad celiaca (EC) es un desorden sistémico crónico que cursa con enteropatía y que se desencadena en individuos genéticamente predispuestos tras la ingesta de gluten, el cual origina una reacción inmunitaria en la que participan distintas células y moléculas y que puede originar efectos intestinales y extraintestinales.

La EC es una de las patologías crónicas intestinales más frecuentes y su prevalencia va en aumento en las últimas décadas. Esto se debe, en parte, a la globalización, que ha supuesto un incremento del consumo de productos ricos en gluten, término que hace referencia al conjunto de proteínas ricas en glutamina y prolina presentes en distintos tipos de cereales, principalmente en el centeno, el trigo y la cebada. Además, el mejor conocimiento de la enfermedad y de las técnicas diagnósticas también ha contribuido al aumento de la prevalencia, puesto que ha permitido diagnosticar a un mayor número de personas.

En general, se estima que el 1% de la población global padece esta patología, aunque este porcentaje varía dependiendo de la zona geográfica y de la edad. Además, esta cifra se corresponde con los pacientes diagnosticados, pero hay una gran cantidad de población que padece la enfermedad y no está diagnosticada. Se estima que por cada niño celiaco diagnosticado existen otros cuatro sin diagnosticar y en el caso de los adultos este porcentaje es todavía menor, aproximadamente solo uno de cada 9 adultos celiacos está diagnosticado.

GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD

Actualmente, se considera que la EC posee un alto grado de heredabilidad y ha sido caracterizada como una enfermedad poligénica con una compleja herencia no-mendeliana que afecta tanto a genes HLA como a otros ubicados fuera de esta localización del genoma.

- **Genética asociada al HLA**

El principal factor genético asociado a un mayor riesgo de desarrollo de la EC recae sobre la región del genoma que codifica el HLA.

El HLA o complejo principal de histocompatibilidad es un complejo de glicoproteínas localizado, principalmente, en la membrana celular. Se divide en HLA de clase I, II y III.

Determinadas variantes en dos genes de HLA de clase II, *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1*, se han relacionado con mayor riesgo a padecer la enfermedad. Esos genes codifican las cadenas peptídicas α y β que conforman la molécula HLA-DQ. A diferencia del HLA de tipo I, esta molécula solo se expresa en las células presentadoras de antígeno profesionales: los linfocitos B, los macrófagos y las células

dendríticas, principalmente. Estas células presentarán sus péptidos a los linfocitos T CD4 y, aquellos que posean un TCR capaz de reconocer dicho péptido se activarán y sintetizarán distintas citoquinas que modularán la respuesta inmunitaria.

Los genes HLA son polimórficos, en la población existen muchas variantes de estas moléculas que son capaces de unir péptidos de distinta naturaleza. Además, estos genes poseen codominancia, es decir, que en cada individuo se expresan los dos alelos.

En la década de 1970 se demostró la asociación entre los genes HLA y el riesgo de desarrollar la EC. Apenas una década después los alelos que codifican la molécula HLA-DQ2 se establecieron como los principales responsables del riesgo genético de padecer la patología. Cerca del 90-95% de los pacientes de EC expresan la molécula HLA-DQ2 y aproximadamente todos los restantes la molécula HLA-DQ8.

Los factores de riesgo asociados a las variantes genéticas de HLA-DQ dan cuenta del 22% de la heredabilidad de la EC mientras que si se tiene en cuenta el riesgo asociado a las variantes de otras moléculas de HLA (como HLA-DP o HLA-DR) este porcentaje asciende hasta el 25%.

- **Otros factores genéticos**

Durante mucho tiempo solo determinadas variantes genéticas del HLA (especialmente las que daban lugar a la aparición de las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8) se relacionaron con un mayor riesgo de padecer la EC. Sin embargo, se estima que el 40% de la población europea posee al menos una de estas variantes moleculares HLA-DQ pero solo el 1% llega a desarrollarla, por tanto, parece lógico pensar que existen otros factores (genéticos y ambientales) que deben estar relacionados con el desarrollo de la EC.

El desarrollo de estudios de asociación genética a gran escala (*GWAS*, *Genome Wide Association Studies*) supuso un gran avance en la detección de regiones del genoma relacionadas con numerosas enfermedades. Estos proyectos se basaban en el estudio de multitud de variantes genéticas (en la gran mayoría de los casos polimorfismos de un único nucleótido, SNPs) repartidas a lo largo de todo el genoma en personas sanas y pacientes de una determinada enfermedad. El primer GWAS realizado sobre la EC permitió detectar una sola región no-HLA asociada con la enfermedad: la región que incluía los genes *IL2-IL21*, pues en ella existía elevado desequilibrio de ligamiento y no se podía distinguir cuál era el gen asociado. Posteriormente, se comprobó que dicha región guardaba relación con múltiples enfermedades autoinmunes.

Más tarde, los estudios de "follow up" permitieron identificar otras nuevas regiones no HLA asociadas con la enfermedad. Estos segundos estudios rescataron aquellas variantes que en el proyecto GWAS dieron una fuerte asociación con una

determinada enfermedad pero que no llegaban a superar el umbral de significación establecido en dicho proyecto. Por tanto, tomando una nueva muestra y nuevos controles se repitieron los experimentos anteriores y se aceptó que aquellas variantes que volvieron a mostrar una fuerte asociación estaban relacionadas con la enfermedad.

Un siguiente proyecto realizado con el objetivo de identificar un mayor número de variantes genéticas asociadas a la EC y a otras enfermedades autoinmunes fue el llamado proyecto "ImmunoChip", que estudió las variantes genéticas previamente asociadas a cada enfermedad autoinmune en pacientes de las restantes enfermedades autoinmunes. Por ejemplo: se estudiaron las variantes genéticas claramente asociadas a artritis reumatoide en pacientes de diabetes tipo I, lupus eritematoso sistémico, EC... Se comprobó que 36 de estas regiones mostraban una gran asociación con la EC. Recientes estudios realizados por otros autores elevan el número de loci no-HLA relacionados con la EC a 42.

Actualmente, teniendo en cuenta las variantes genéticas HLA y no-HLA asociadas a la patología se puede llegar a explicar el 31% de la heredabilidad de la EC.

Las variantes alélicas con una frecuencia en la población entre un 5-10% (variantes raras) se excluyeron de los estudios de GWAS y durante mucho tiempo se pensó que estas variantes explicarían el resto de la heredabilidad de la EC. Sin embargo, diferentes estudios posteriores mostraron que estas variantes poco frecuentes no eran capaces de explicar el resto de la heredabilidad de la enfermedad, que pasó a denominarse "heredabilidad perdida".

El proyecto GWAS puso de manifiesto que el 90% de las regiones del genoma asociadas a la enfermedad estaban localizadas en regiones no codificantes. Numerosos estudios demuestran que las regiones del genoma que no codifican proteínas juegan un papel fundamental en la expresión génica y en el riesgo a padecer la EC.

INMUNOPATOGÉNESIS DE LA EC

En primer lugar, la llegada del gluten y los péptidos derivados de éste al intestino desencadena un cierto efecto tóxico que todavía no se conoce muy bien y que va a originar una respuesta por parte del sistema inmunitario innato, el cual va a alterar las uniones entre las células epiteliales, incrementando así la permeabilidad del epitelio y favoreciendo el paso del gluten a través de éste.

Una vez en la lámina propia, se va a producir la desamidación de los péptidos del gluten por parte de la enzima transglutaminasa 2 (TG2). Estos péptidos modificados van a ser captados por las células presentadores de antígenos, las cuales los van a presentar a los linfocitos TCD4 a través de las moléculas HLA-DQ, sobre todo HLA-DQ2 y HLA-DQ8. A continuación se desencadena una respuesta celular y humoral con producción de anticuerpos y de citoquinas, y son estas citoquinas las que podrían perpetuar la respuesta inmunitaria e incrementar la permeabilidad del epitelio. Posteriormente, se produce la infiltración, principalmente de linfocitos TCD8 en el epitelio como respuesta a las citoquinas liberadas. Finalmente, tiene

lugar la destrucción de las células epiteliales por parte de los linfocitos TCD8.

En algunos casos, los linfocitos B reconocen la TG2 que tiene unido el péptido modificado. Todo este complejo va a ser endocitado por el linfocito B. En este punto se produce la presentación de péptidos al linfocito T CD4, tanto de la TG2 como del péptido modificado. De modo que se activa el linfocito T por la presencia del péptido modificado. La activación del linfocito T induce la producción de anticuerpos por las células plasmáticas contra la TG2, que es lo que estos linfocitos B han reconocido del complejo. Esto último explica la presencia de anticuerpos frente a esta enzima en el suero de la mayoría de pacientes celíacos.

La presencia conjunta de atrofia intestinal, anticuerpos y genética HLA de riesgo se está utilizando actualmente como criterio diagnóstico. Sin embargo, conviene recalcar que a día de hoy no se ha encontrado relación entre los anticuerpos frente a la TG2 y la patología intestinal de los pacientes. Por tanto, no es de extrañar, que dentro de los pacientes celíacos se den casos de enfermos que no presentan los anticuerpos anteriormente citados.

Los linfocitos T CD4 juegan un papel fundamental en la patogénesis de la EC. Los linfocitos T se encargan de producir las citoquinas proinflamatorias (interferón gamma e IL-21, fundamentalmente) que propician la activación de los linfocitos T CD8 y su acción sobre las células epiteliales del intestino. Además, estos linfocitos T CD4 también están implicados en la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos.

• Papel de las variantes HLA en la inmunopatogénesis de la EC

Las moléculas HLA-DQ tradicionalmente asociadas con la enfermedad (HLA-DQ2 y HLA-DQ8) presentan una gran afinidad para unir péptidos de gluten, especialmente tras ser desamidados por la TG2. Esta enzima, ubicada en muchos tejidos, cataliza una reacción de desamidación sobre los péptidos de gluten aumentando así su carga neta negativa y favoreciendo su interacción con las moléculas de HLA-DQ2/DQ8, lo que supone un paso fundamental en la patogénesis de la EC.

Las moléculas HLA-DQ8 y HLA-DQ2 se diferencian en su capacidad para unir péptidos con residuos cargados

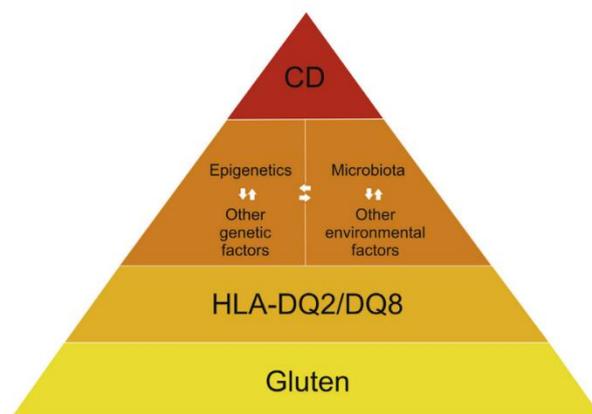


Figura 16. Factores relacionados con el desarrollo de la EC. Tomado de: Dieli-Crimi R *et al*, 2015

negativamente en diferentes posiciones. De los dos tipos de moléculas, HLA-DQ2 se relaciona con un mayor riesgo de padecer la enfermedad debido a la enorme variedad de péptidos que es capaz de unir y a la gran estabilidad de los complejos péptido-HLA.

• **Papel de las variantes no-HLA en la inmunopatogénesis de la EC**

No todas las personas que expresan las moléculas HLA-DQ2/DQ8 desarrollan la enfermedad por lo que existen otros factores implicados, entre ellos algunas variantes genéticas no relacionados con las regiones HLA. A pesar de que se han puesto de manifiesto diferentes variaciones genéticas que parecen estar relacionadas con la EC, actualmente se conocen pocos genes cuyo papel en la patogénesis de la enfermedad esté claro, aunque sí se ha visto que muchos de estos genes están relacionados con el sistema inmunitario. No obstante, una gran cantidad de las variantes genéticas asociadas con la patología se han hallado en regiones no codificantes del genoma, lo que indica que podrían tener un importante papel en la regulación de la expresión génica que explicaría su relación con la enfermedad.

Sin embargo, sí se ha podido comprobar que una gran cantidad de los genes no-HLA asociados con la EC están involucrados en la activación y diferenciación de los linfocitos T, que desempeñan un papel crucial en la enfermedad.

Por tanto, la EC es una patología compleja que se inicia con la ingesta de gluten en personas genéticamente

predispuestas (HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8). No obstante, existen otros factores genéticos relacionados con la enfermedad (regiones no-HLA, en muchos casos asociadas con la regulación epigenética). Del mismo modo, recientes estudios parecen indicar que la microbiota intestinal también desempeña un papel clave en la patología. La suma de todos estos factores es lo que explica el desarrollo de la EC.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA EC

La EC es una patología muy compleja con una gran variedad de síntomas que pueden ser tanto intestinales como extraintestinales. Los niños afectados por esta patología, generalmente, debutan con una clínica intestinal, denominada clínica clásica: distensión abdominal, diarrea crónica y síndrome de malabsorción. Sin embargo, en algunas ocasiones pueden aparecer otros síntomas como: anemia, pérdida de peso, fallo de medro, etc.

Con respecto a los adultos, las manifestaciones clínicas están menos definidas e incluyen una amplia sintomatología desde la clásica digestiva a: faringitis, dolor lumbar, amenorrea, menopausia precoz, calambres musculares, etc.

• **La EC y la infertilidad**

Entre las manifestaciones extraintestinales de la enfermedad se encuentra la infertilidad. Los pacientes con EC que mantienen una dieta rica en gluten pueden sufrir alteraciones

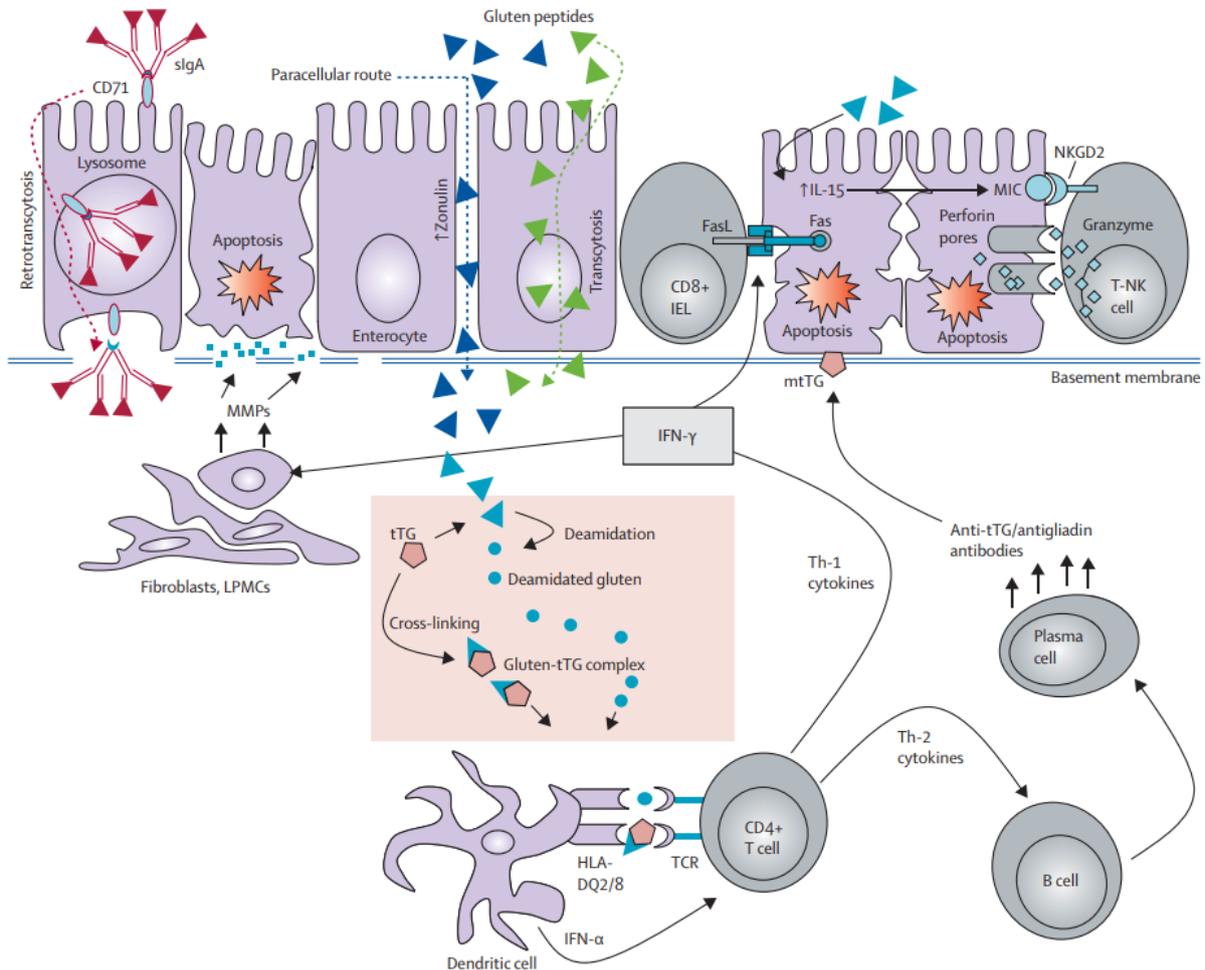


Figura 2. Inmunopatogénesis de la EC. Tomado de: Di Sabatino A *et al*, 2009

reproductivas como: retraso en la menarquia, menopausia precoz, amenorrea, impotencia, hipogonadismo, abortos de repetición... En algunos casos, los pacientes no presentan otros síntomas más allá de la infertilidad, lo que dificulta el diagnóstico de EC y explica que estos pacientes acaben siendo diagnosticados de infertilidad idiopática.

En 1970 se describió por primera vez que tres mujeres celiacas consiguieron tener recién nacidos sanos tras iniciar una dieta sin gluten. A partir de ese momento, se incrementó enormemente el número de trabajos centrados en estudiar la relación entre la EC y la infertilidad.

Gracias a estos estudios surgieron dos teorías para explicar el mecanismo patogénico subyacente:

Teoría centrada en déficits nutricionales

Esta teoría se basa en el papel que algunos elementos traza y ciertas vitaminas desempeñan para el correcto funcionamiento del aparato reproductor. La atrofia de las vellosidades intestinales, que presentan las pacientes celiacas sin tratamiento, reduce la absorción intestinal de estos y otros compuestos, lo que explica los niveles séricos más reducidos de selenio, zinc y ácido fólico con respecto a los de las mujeres celiacas con dieta sin gluten. Esta teoría para explicar la relación entre ambas patologías fue la que se mantuvo inicialmente. Sin embargo, existían pacientes celiacas con niveles normales de los distintos nutrientes que fueron diagnosticadas de infertilidad idiopática, por lo que se plantearon otras teorías que no guardaban relación con la malabsorción.

Teoría centrada en la autoinmunidad

Esta teoría es la que más relevancia ha adquirido en los últimos años y se basa en los procesos autoinmunes que experimentan los pacientes celiacos. La mayoría de los pacientes sintetizan autoanticuerpos frente a la TG2. Esta enzima se expresa en diferentes tejidos tanto a nivel intracelular como extracelular. La presencia de TG2 en el endometrio sustenta esta teoría, que se basa en que los autoanticuerpos podrían impedir la implantación del embrión en el útero y el correcto desarrollo de la placenta. Esto último explicaría el bajo peso al nacimiento que en ocasiones presentan los hijos de las mujeres celiacas sin tratamiento. Sin embargo, a día de hoy se sabe que no todos los pacientes celiacos presentan anticuerpos frente a la TG2 por lo que esta teoría tampoco permite explicar totalmente la relación entre la EC y la infertilidad.

Actualmente, todavía se desconocen muchos de los mecanismos inmunopatogénicos de la EC, por lo que no es de extrañar que el mecanismo por el que esta patología está relacionada con la infertilidad no esté claro.

En cuanto a los estudios de prevalencia, en 1976 se llevó a cabo el primer cribado de EC sobre 77 mujeres con infertilidad y se confirmó la presencia de la patología en dos de ellas, que consiguieron un embarazo tras iniciar una dieta sin gluten. A partir de este momento, los resultados obtenidos en los diferentes estudios fueron muy discordantes, mientras algunos autores mantenían que la prevalencia de la EC era mayor en población infértil (en algunos casos hasta tres veces más que en la población general), otros sostenían que la prevalencia de la enfermedad era la misma en pacientes

que en controles y por tanto tampoco había diferencias de prevalencia con respecto a la población general. Esta polémica se ha mantenido hasta hoy en día y en la actualidad en la práctica clínica no es común llevar a cabo un cribado de EC en mujeres con infertilidad.

Los últimos meta-análisis sugieren que la prevalencia de la EC sobre población infértil se encuentra entre un 1,5-2,2%, mientras que la prevalencia de la enfermedad en el grupo control seleccionado de la misma población se sitúa en torno al 0,5-0,8%. Por otro lado, la prevalencia de la enfermedad sobre la población general se encuentra en torno al 1%, aunque hay que tener presente que este valor está fundamentalmente basado en niños, mientras que estos no forman parte de los estudios de infertilidad. En adultos, la prevalencia de la patología se encuentra en torno a un 0,5% por tanto, la prevalencia de la EC en población infértil parece al menos el doble que en población general, por lo que aunque son necesarios más estudios, habría que plantearse si es conveniente utilizar un test de cribado de la enfermedad en estas pacientes para identificar a las mujeres celiacas e iniciar una dieta sin gluten, mejorando muy probablemente los resultados de gestación sin necesidad de recurrir a tratamientos hormonales que son poco eficaces en este grupo de pacientes.

DIAGNÓSTICO DE LA EC

Para el diagnóstico de la EC se suelen tener en cuenta cuatro aspectos:

- **Clínica**

Se presta atención a multitud de síntomas, entre ellos los anteriormente descritos como la clínica digestiva o la pérdida de peso.

- **Pruebas serológicas**

Ante la sospecha de la enfermedad se suele optar por medir anticuerpos en suero. Se pueden detectar distintos tipos de anticuerpos, aunque el más común es IgA frente a TG2. En el caso de que este anticuerpo no se detecte y no haya ningún indicio claro más que oriente hacia la EC, se suele descartar su diagnóstico. No obstante, hay que tener presente que, al igual que otras pruebas, en ocasiones aparecen falsos negativos. Un caso muy común, es en pacientes que presentan deficiencia selectiva de IgA, por lo que para evitar la presencia de estos falsos negativos, se suele cuantificar la cantidad total de IgA en suero y en el caso de que los valores obtenidos sean inferiores a los valores de referencia, se recurre a la determinación de anticuerpos IgG frente a dicha proteína o frente a péptidos desamidados de gluten.

Otro tipo de prueba serológica utilizada es la determinación de anticuerpos anti-endomisio. En verdad estos anticuerpos están dirigidos frente al mismo antígeno pero su detección se realiza directamente sobre músculo, donde la TG2 tiene una conformación más similar a la que aparece en el intestino. Se trata de una prueba de inmunofluorescencia que está sujeta a subjetividad, por lo que no siempre se realiza. En cualquier caso, se considera una prueba muy específica y un resultado positivo implica una alta probabilidad de la presencia de la

EC. En la actualidad la presencia de altos títulos de anti-TG2 (más de diez veces el límite superior de normalidad) corroborado con anticuerpos anti-endomisio positivos en una segunda muestra de sangre permiten el diagnóstico de la enfermedad en niños sin necesidad de recurrir a la biopsia de duodeno.

Finalmente, también se puede realizar la detección de anticuerpos frente a los péptidos de gliadina desamidada, aunque presentan menor sensibilidad y especificidad.

A pesar de que hoy en día se sabe que no todos los pacientes celíacos presentan los anticuerpos anteriormente descritos, un resultado negativo en las pruebas serológicas suelen descartar el diagnóstico de la EC a no ser que haya otros indicios fuertes que orienten hacia esta patología.

- **Perfil genético**

La EC está fuertemente asociada con la expresión de moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8, por lo que la presencia de los alelos que codifican dichas moléculas se considera necesaria para padecer la enfermedad, aunque no suficiente. Por tanto, la prueba genética se emplea para descartar la EC.

En general, se realiza principalmente sobre individuos de algún grupo de riesgo (pacientes con otras enfermedades autoinmunes o parientes de primer grado de algún paciente con este tipo de patologías) para decidir si seguir o no el estudio de EC. También en casos de diagnóstico dudoso como pacientes que carecen de serología específica o pacientes con una lesión de bajo grado.

- **Biopsia duodenal**

Hasta el año 2012 era necesaria para confirmar la presencia de la EC. Desde ese año continúa siendo necesaria para el diagnóstico de todos los adultos y de niños con bajos títulos de anticuerpo. En el caso de un paciente celíaco, en la biopsia se espera observar atrofia de las vellosidades intestinales y cierto grado de infiltración linfocitaria. El grado de lesión normalmente se clasifica atendiendo a la escala modificada de Marsh. Aunque es cierto que la lesión intestinal puede aparecer en otras enfermedades, junto con el resto de los criterios permite confirmar definitivamente la enfermedad.

Actualmente, sobre las biopsias de duodeno se pueden llevar a cabo adicionalmente dos determinaciones complementarias que contribuyen al diagnóstico de aquellos pacientes con bajo grado de atrofia (Marsh 1-2) y pacientes sin serología específica: el linfograma intraepitelial y el estudio de depósitos subepiteliales de IgA anti-TG2. Ambos presentan una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la EC.

El linfograma intraepitelial se determina mediante el estudio por citometría de flujo de las distintas poblaciones linfocitarias aisladas a partir de la biopsia de duodeno. Los pacientes celíacos muestran un incremento significativo de la subpoblación de linfocitos T TCR- $\gamma\delta$ incluso sin presencia de atrofia. En el año 2018 se incluyó en el protocolo diagnóstico de nuestro país.

A pesar de todos estos criterios diagnósticos, se estima que solo el 20% de los niños celíacos están diagnosticados y este

porcentaje es mucho menor en el caso de los adultos. La instauración de una dieta sin gluten origina el cese de la respuesta inmunitaria, lo que permite la recuperación de la mucosa intestinal y la desaparición de los síntomas clínicos. Por tanto, la existencia de un diagnóstico precoz es verdaderamente relevante a la hora de tratar esta enfermedad pues de mantenerse la ingesta de gluten pueden aparecer serias complicaciones (infertilidad, osteoporosis...) que comprometen seriamente la salud.

Para identificar nuevos marcadores diagnósticos es fundamental estudiar en profundidad esta patología: los cambios en el porcentaje de tipos celulares específicos, así como de las moléculas solubles en sangre periférica y los niveles de expresión de los genes asociados a la enfermedad. Gracias a estos estudios, están surgiendo distintos potenciales biomarcadores.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Concepción Núñez Pardo de Vera del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San Carlos (IdISSC) sus consejos y correcciones en la elaboración de este documento.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Levinson-Castiel R, Eliakim R, Shinar E, Perets TT, Layfer O, Levhar N et al. Rising prevalence of celiac disease is not universal and repeated testing is needed for population screening. *United European Gastroenterol J.* 2019;7(3):412-18.
- Husby S, Murray JA, Katzka DA. AGA Clinical Practice Update on Diagnosis and Monitoring of Celiac Disease-Changing Utility of Serology and Histologic Measures: Expert Review. *Gastroenterology.* 2019 Mar;156(4):885-889.
- Castaño M, Gómez-Gordo R, Cuevas D, Núñez C. Systematic Review and Meta-Analysis of Prevalence of Coeliac Disease in Women with Infertility. *Nutrients.* 2019 Aug 20;11(8):1950.
- Grupo de trabajo del Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2018. Disponible en: <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/prestacionesSanitarias/publicaciones/Celiaquia/enfermedadCeliaca.pdf>
- Dieli-Crimi R, Cenit MC, Nunez C. The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications. *J Autoimmun.* 2015; 64:26-41.
- Ozogor B, Selimoglu MA. Coeliac disease and reproductive disorders. *Scand J Gastroenterol.* 2010;45:395-402.
- Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet.* 2009; 25;373-9673.

INMUNOTERAPIA EN MIELOMA MÚLTIPLE REFRACTARIO

Autores: Laura Díez Alonso¹, Rodrigo Coloma Gutiérrez², Carmen Domínguez Alonso¹

¹ Unidad de Inmunoterapia del Cáncer, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

² Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Inmunoterapia, Inmuno-oncología, Hematología

INTRODUCCIÓN

La inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento del cáncer en los últimos tiempos, redirigiendo al sistema inmune para que actúe eficazmente en la eliminación de las células tumorales¹.

El objetivo de la inmunoterapia basada en la redirección de células T² es mejorar la eficacia de las respuestas antitumorales mediadas por estas células. Las principales aproximaciones utilizadas actualmente consisten en tratar de convertir antígenos específicos de tumor (*tumor-associated antigens*, TAA) en “puntos de reclutamiento” de linfocitos T efectores, consiguiendo su activación de forma MHC independiente, e incluyen:

- La administración sistémica de anticuerpos biespecíficos, que combinan la fracción de reconocimiento de un anticuerpo dirigido frente a un antígeno específico de tumor con la de un anticuerpo dirigido frente a CD3 en linfocitos T. La transferencia de linfocitos T que expresan receptores de antígeno quiméricos (CARs), compuestos por un dominio extracelular de reconocimiento antigénico en el tumor, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que señala para su activación.

La inmunoterapia frente al antígeno CD19 ha demostrado eficacia clínica en neoplasias hematológicas de células B³. En vista de los prometedores resultados en pacientes con leucemia linfocítica refractaria y linfoma con dos productos CAR-T aprobados por la FDA (tisagenlecleucel, Kymriah® y axicabtagene ciloleucel, Yescarta®) y el anticuerpo biespecífico anti-CD19-CD3 (Blinatumomab, Blincyto®), se ha visto impulsado el desarrollo de nuevas estrategias de inmunoterapia para el tratamiento de otras neoplasias de células B, como lo es el mieloma múltiple⁴.

El mieloma múltiple es la segunda neoplasia hematológica más común⁵, que supone un 1% de todos los tipos de cáncer y un 10% de los tumores hematológicos⁶, y se caracteriza por la proliferación de células plasmáticas aberrantes en la médula ósea que producen inmunoglobulinas afuncionales. La enfermedad comienza por un estado precursor asintomático (gammapatía monoclonal de significado incierto, MGUS), posteriormente, diversos cambios genéticos y en el microambiente tumoral de la médula ósea llevan al desarrollo de la enfermedad⁷, que se caracteriza por lesiones óseas osteolíticas, hipercalcemia, fallo renal y disfunción progresiva de la médula ósea (citopenias). La media de edad al diagnóstico es de 65 años, con una supervivencia a 5 años en torno al 50%.

El tratamiento del mieloma múltiple ha avanzado mucho los últimos tiempos gracias a la introducción de nuevos agentes terapéuticos, como son los inhibidores del proteasoma

(bortezomib, ixazomib), inmunomoduladores (talidomida, lenalidomida) e inhibidores de histona desacetilasas (panobinostat)⁸, a pesar de lo cual sigue siendo una enfermedad incurable (Figura 1). La inmunoterapia representa uno de los mayores avances en el tratamiento de mieloma refractario, desarrollándose multitud de productos que se encuentran en ensayos en diferentes fases preclínicas y clínicas, incluyendo anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos y terapia celular adoptiva (CAR-T), entre otros⁹.

Por otro lado, es especialmente importante conocer los mecanismos implicados en el desarrollo de esta enfermedad para predecir el pronóstico y respuesta al tratamiento, ya que el microambiente tumoral altamente inmunosupresor de la médula ósea y la gran heterogeneidad de cambios genéticos son indispensables a la hora de entender la patogénesis de la enfermedad, la progresión y la respuesta al tratamiento. Un clon minoritario de células plasmáticas aberrantes presentes al inicio de la enfermedad puede emerger posteriormente o tras el tratamiento como el clon más agresivo y resistente¹⁰, y hay que tener en cuenta que, como ya se ha mencionado, el microambiente tumoral de la médula ósea en esta enfermedad es muy inmunosupresor, lo que es de especial interés a tener en cuenta en el caso de terapias dirigidas al sistema inmune.

Lo más importante a la hora de desarrollar estrategias de inmunoterapia de células T es la elección del antígeno asociado a tumor frente al que va a ir dirigido. El antígeno ideal es aquel que se expresa amplia y a ser posible, exclusivamente en las células tumorales pero no en las células sanas, para mejorar la eficacia del tratamiento y reducir la toxicidad.

En el mieloma múltiple, gran parte de las estrategias de inmunoterapia en desarrollo se dirigen al antígeno BCMA (CD269, *B-cell maturation antigen*), miembro de la familia TNFRSF17, que regula la maduración, proliferación y supervivencia de las células B (Figura 2). Sus ligandos naturales son BAFF y APRIL, y representa una diana interesante en mieloma múltiple pues su expresión está restringida a la población B madura, siendo mayor su expresión en las células plasmáticas aberrantes frente a las normales^{11,12}, y se encuentra ausente en otras poblaciones de células B o en tejidos sanos.

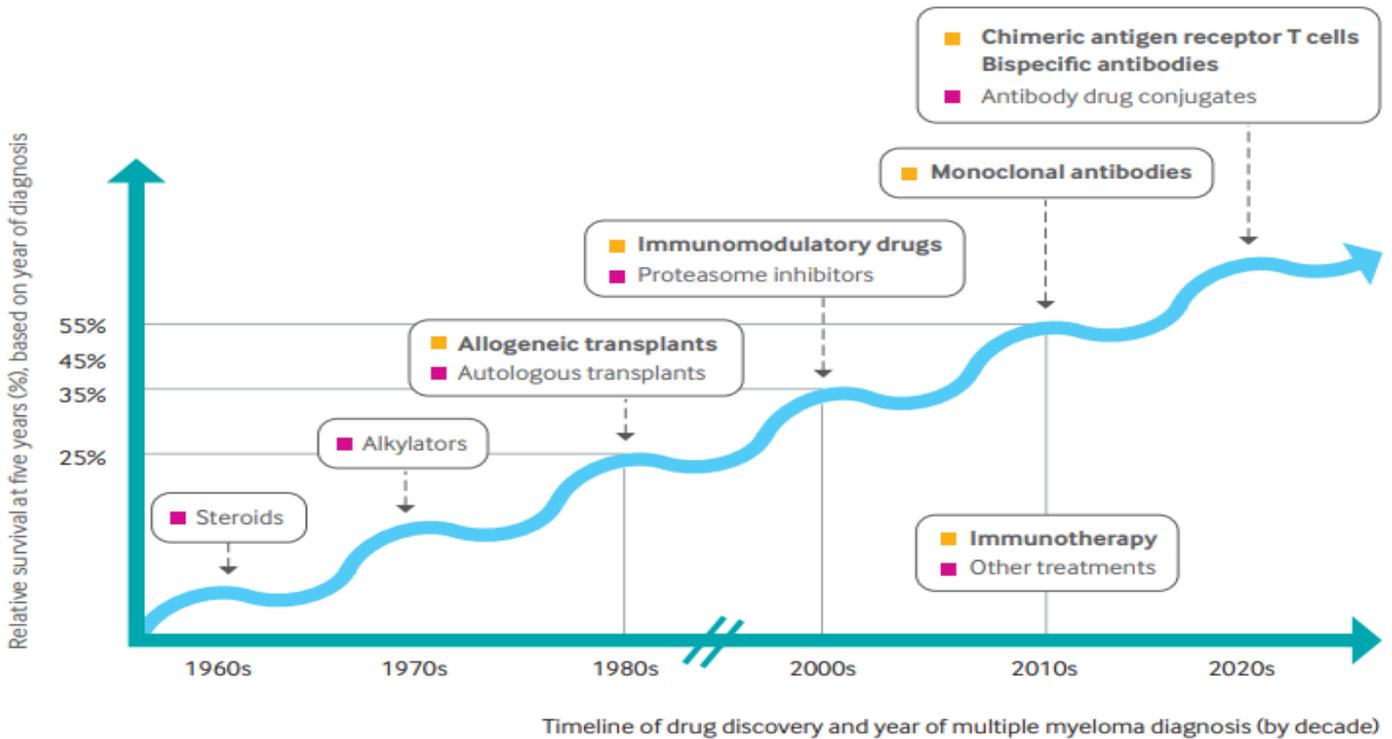


Figura 1. Evolución de los tratamientos del mieloma múltiple refractario. Obtenido de: Mailankody S. et al, *BMJ* 2020

Estos nuevos agentes presentan respuestas muy prometedoras con un llamativo aumento de la supervivencia, pero gran parte de los pacientes todavía desarrollan recaídas.

Los resultados de ensayos clínicos con inmunoterapia frente a BCMA son muy prometedores con tasas de respuesta muy altas¹³⁻¹⁷. Sin embargo, las recaídas tras el tratamiento son frecuentes principalmente por fenómenos de escape tumoral¹⁸, es decir, pérdida del antígeno BCMA en superficie por parte de las células tumorales. Por ello es muy importante buscar nuevas dianas terapéuticas o utilizar estrategias multi-diana¹⁹ con la infusión de distintos productos CAR-T simultáneamente, o secuenciales, como detallaremos a continuación.

Por tanto y en vista de los resultados de la inmunoterapia frente a BCMA en mieloma múltiple refractario se presentan los siguientes retos:

- Mejorar el perfil de toxicidad (algo generalizado para todo este tipo de terapias)
- Aumentar la especificidad (elección del antígeno diana)
- Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y posibilidad de estrategias multi-diana (para evitar escape tumoral)
- Terapias dirigidas al microambiente tumoral inmunosupresor en médula ósea.

CAR-T EN MIELOMA MÚLTIPLE REFRACTARIO

Las células CAR-T son células T humanas que se han modificado genéticamente y se han expandido en el laboratorio antes de que se vuelvan a infundir en los pacientes para atacar el tumor.

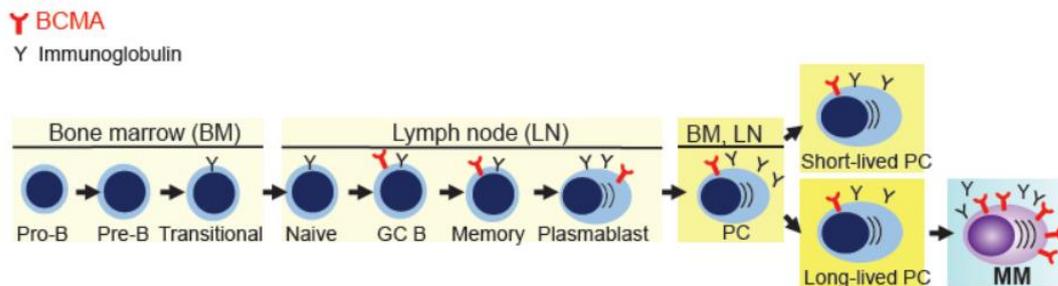


Figura 2. Papel de BCMA (*B cell maturation antigen*) en la maduración de células B. Obtenido de: Cho et al, 2018

El receptor en la superficie de las células CAR-T que se dirige a los antígenos tumorales consta de varias partes: un dominio de direccionamiento al antígeno tumoral, generalmente derivado de un fragmento variable de cadena única de un anticuerpo monoclonal, una región espaciadora o bisagra, un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular que incluye el dominio de activación de CD3 ζ (cadena activadora del TCR) y un dominio de coestimulación (derivado por ejemplo, de CD28 o 4-1BB) (Figura 3).

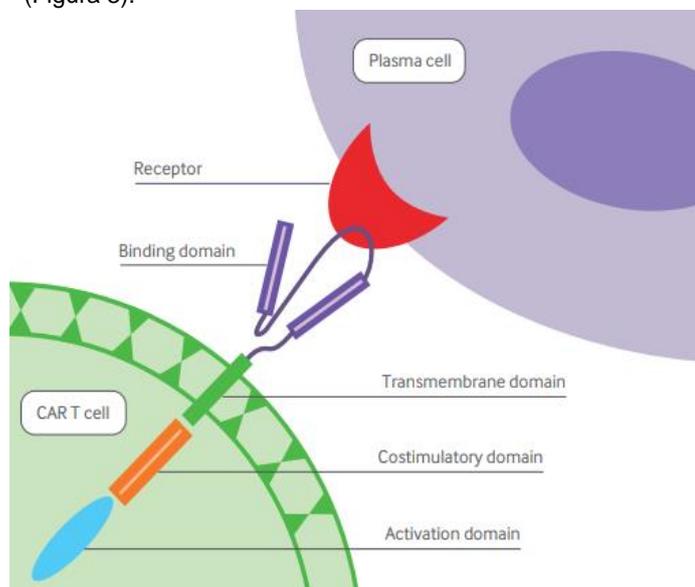


Figura 3. Estructura esquemática de un receptor CAR. Obtenido de: Mailankody S. *et al*, 2020

El fragmento variable de cadena sencilla se derivó originalmente de ratones (de ahí el término quimérico), pero muchas de las construcciones más nuevas son completamente humanas (para mejorar la eficacia y reducir toxicidad)

Las células T se obtienen de los pacientes (células CAR-T autólogas) o de donantes sanos (células CAR-T alogénicas) mediante leucoaféresis. Estas células se expanden posteriormente en cultivo y son activadas con *beads* marcadas con anticuerpos monoclonales anti-CD28 y anti-CD3. Las células son posteriormente transducidas con un vector (habitualmente lentiviral o retroviral) que contiene el gen codificante para el receptor quimérico frente al antígeno tumoral. El proceso de producción lleva unas 4 semanas en condiciones *Good Manufacturing Practice* (GMP) y las células CAR-T pueden ser almacenadas en criopreservación hasta su infusión en el paciente. Este retraso en la producción supone que el paciente puede progresar la enfermedad durante este tiempo, por lo que es necesaria quimioterapia de puente hasta la administración del tratamiento.

Aproximadamente una semana antes de la infusión de las células CAR-T, el paciente recibe quimioterapia para linfodepleción, de cara a favorecer la adecuada implantación de las células CAR-T tras la infusión. Una vez infundidas, las células CAR-T reconocerán el antígeno tumoral, proliferarán y eliminarán las células tumorales.

Hay multitud de productos CAR-T dirigidos frente al antígeno BCMA en mieloma múltiple refractario en ensayos clínicos, en fase I o II a la espera de aprobación por los organismos reguladores.

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS EN MIELOMA MÚLTIPLE REFRACTARIO

Son anticuerpos que dirigen las células T citotóxicas al tumor mediante el reconocimiento simultáneo de CD3 en las células T y un antígeno específico del tumor. Un formato especialmente interesante de estos es los BiTE (*bispecific T cell engager*), que contienen dos fragmentos variables de cadena simples conectados mediante un *linker* (Figura 4). Los BiTEs presentan una baja vida media, por lo que requieren administración en infusión continua para mantener una concentración eficaz, y presentan un perfil de toxicidad similar a las células CAR-T, incluyendo síndrome de liberación de citoquinas y neurotoxicidad.

Hay varios productos de este tipo dirigidos frente al antígeno BCMA en ensayos clínicos en distintas fases de desarrollo en la actualidad, incluyendo aquellos que buscan aumentar la vida media de la molécula, la principal limitación.

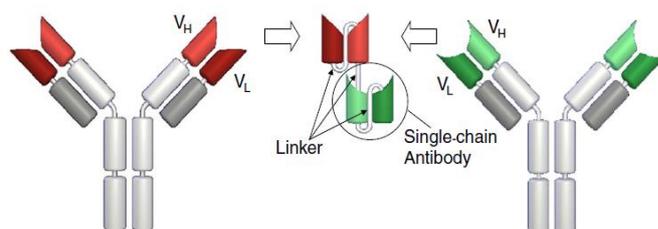


Figura 4. Estructura esquemática de un BiTE (*Bispecific T cell engager*) Obtenido de: Nagorsen *et al*, 2012

OBJETIVOS FUTUROS

A pesar de que los resultados de la inmunoterapia frente a BCMA resultan muy prometedores, con tasas de respuesta muy elevadas (en torno al 80%), la mayoría de los pacientes acaban recayendo, por lo que se debe mejorar es la duración de la respuesta a largo plazo. En este sentido hay varias aproximaciones:

- Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas: CD38, GPRC5D, SLAMF7, CS1 y TAC1 se encuentran en estudio en ensayos clínicos actualmente combinando dos productos CAR-T distintos, CAR-T que reconozcan simultáneamente dos antígenos distintos, o una estrategia secuencial, demostrando buena eficacia y perfil de seguridad en ensayos clínicos en fases aún tempranas.
- Mejorar el proceso de producción o usar este tipo de terapias en etapas más tempranas de la enfermedad donde el tratamiento pueda ser más efectivo y las células del paciente no se encuentren ya tan deterioradas.

- Optimizar el coste-beneficio, para que pueda ser un tratamiento más accesible a la población.
- Mejorar el perfil de seguridad minimizando la toxicidad (síndrome de liberación de citoquinas y neurotoxicidad principalmente) eligiendo el antígeno adecuado (mayor selectividad) o diseñando construcciones completamente humanas (frente a las quiméricas).
- Estudiar posibles combinaciones con otros agentes terapéuticos. Se ha estudiado la combinación de CAR-T con fármacos inmunomoduladores (lenalidomida, iberdomida), inhibidores de inmunocheckpoints (pembrolizumab, anti PD-1) dirigidos contra el microambiente tumoral inmunosupresor, o inhibidores de gamma-secretasa (enzima que lleva a cabo la liberación directa de BCMA de la membrana en forma soluble al medio) de cara a evitar el escape tumoral por pérdida de BCMA en la membrana de las células tumorales.
- Obtención de productos “*off the shelf*” (células CAR-T alogénicas o células CAR-NK)
- Profundizar en el estudio de los mecanismos de esta enfermedad de cara a entender mejor los mecanismos de respuesta o resistencia al tratamiento y cómo podemos actuar sobre ellos.

MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA INMUNOTERAPIA EN MIELOMA MÚLTIPLE REFRACTARIO

- Factores intrínsecos de la célula CAR-T

El cáncer y su agresivo tratamiento pueden afectar a la calidad de células T²⁰. Se ha visto que las células T de memoria temprana son las más adecuadas para el tratamiento con inmunoterapia CAR-T, sin embargo, esta población se encuentra disminuida en los pacientes con un historial más largo de tratamientos antitumorales. De ahí la importancia de comenzar la terapia CAR-T más temprano, de forma que se aumente la persistencia de las células CAR-T *in vivo* y se eviten las recaídas²¹. También se pueden modificar las condiciones de producción o los protocolos de linfodepleción previa; en este sentido, los ensayos clínicos en marcha con células CAR-T en mieloma múltiple refractario son muy heterogéneos en cuanto a tiempos, dosis o fármacos usados (los más habituales son ciclofosfamida y fludarabina). También la humanización del dominio de reconocimiento (a menudo de origen murino) puede mejorar la persistencia *in vivo* y la seguridad²².

- Factores intrínsecos de la célula de mieloma

Las terapias dirigidas a un único antígeno tumoral pueden inducir pérdida o modulación negativa de este antígeno como mecanismo de resistencia al tratamiento. Hay numerosos subclones de células de mieloma, con lo que se puede dar ventaja a la proliferación de un clon con poca o nula expresión de BCMA preexistente tras el tratamiento frente a

esta diana. Así, se han descrito recaídas BCMA tras el tratamiento con terapia CAR-T anti BCMA. Para evitar esto, puede ser interesante dirigirse a varios antígenos simultáneamente¹⁹ mediante la infusión de dos productos CAR-T dirigidos a dos antígenos distintos (coinfusión o infusión secuencial), la cotransducción de dos constructos CAR dirigidos a dos antígenos distintos en la misma población de células, o generar un CAR-T que contiene simultáneamente los dos dominios de reconocimiento del antígeno en una misma molécula (tándem CAR).

- Factores del microambiente tumoral

El microambiente tumoral en mieloma múltiple especialmente importante pues contiene elementos inmunosupresores que pueden afectar a la eficacia del tratamiento con inmunoterapia (células T reguladoras, MDSCs (*myeloid derived suppressor cells*), células B reguladoras, las propias células de mieloma...). Por ello, se está estudiando la combinación de CAR-T con terapias dirigidas frente al microambiente inmunosupresor²³.

OBTENCION DE PRODUCTOS “OFF THE SHELF”

La terapia CAR-T autóloga es muy costosa logísticamente, y requiere tiempos muy elevados desde la leucoaféresis hasta la infusión del producto al paciente, de manera que la enfermedad progresa. Esto se podría solucionar con células CAR-T de donantes sanos (alogénicas), pero a cambio se requiere mecanismo de edición del genoma (disrupción de TCR endógeno) de estas células de cara a evitar fenómenos de enfermedad injerto contra huésped²⁴.

NECESIDAD DE ESTANDARIZACION DE PROTOCOLOS DE ENSAYOS CLINICOS

La evidencia científica disponible en cuanto a inmunoterapia en mieloma múltiple refractario es limitada todavía debido a gran heterogeneidad en cuanto a:

- Diseño de ensayos clínicos (diversidad de productos CAR-T, diferentes dosis y posologías).
- Comunicación de los resultados, se está haciendo un gran esfuerzo en unificar esto para que puedan ser adecuadamente comparados entre sí (método de medida del grado de CRS, método de detección de células CAR-T o métodos de estudio de enfermedad mínima residual, entre otros).

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. Science. 2013 Dec 20;342(6165):1417. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.342.6165.1432>
2. Slaney CY, Wang P, Darcy PK, Kershaw MH.. CARs versus BiTEs: A comparison between T cell–redirection strategies for cancer treatment. Cancer Discov.

- 2018;8(8),924–34. Disponible en: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0297>
3. Park JH, Rivière I, Gonen M, Wang X, Sénéchal B, Curran KJ, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378(5):449-459. Disponible en: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709919>
 4. Jacoby E, Shahani SA, Shah NN. Updates on CAR T-cell therapy in B-cell malignancies. *Immunol Rev.* 2019 Jul;290(1):39-59. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/immr.12774>
 5. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):e538-48. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)
 6. Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol.* 2016 Dec;43(6):676-81. Disponible en: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.11.004>
 7. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2011;364(11):1046-60. Disponible en: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1011442>
 8. Sonneveld P. Management of multiple myeloma in the relapsed/refractory patient. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2017 Dec 8;2017(1):508-17. Disponible en: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.508>
 9. Franssen L, Mutis T, Lokhorst HM, van de Donk NV. Immunotherapy in myeloma: how far have we come. *Ther Adv Hematol.* 2019. Jan 18;10:2040620718822660. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/2040620718822660>
 10. Paiva B, Puig N, Cedena MT, de Jong BG, Ruiz Y, Rapado I, et al. Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance. *Leukemia.* 2017;31(2):382–92. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/leu.2016.211>
 11. Cho S-F, Anderson KC, Tai Y. Targeting B Cell Maturation Antigen (BCMA) in Multiple Myeloma: Potential Uses of BCMA-Based Immunotherapy. *Front Immunol.* 2018 Aug 10;9:1821. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01821>
 12. Bu DX, Singh R, Choi EE, Ruella M, Núñez-Cruz S, Mansfield KG, et al. Pre-clinical validation of B cell maturation antigen (BCMA) as a target for T cell immunotherapy of multiple myeloma. *Oncotarget.* 2018 ;9(40):25764-2578. Disponible en: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25359>
 13. Friedman KM, Garrett TE, Evans JW, Horton HM, Latimer HJ, Seidel SL, et al. Effective Targeting of Multiple B-Cell Maturation Antigen–Expressing Hematological Malignancies by Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Hum Gene Therapy.* 2018 May;29(5):585-601. Disponible en: <https://doi.org/10.1089/hum.2018.001>
 14. Sánchez E, Smith EJ, Yashar MA, Patil S, Li M, Porter AL, et al. The Role of B-Cell Maturation Antigen in the Biology and Management of, and as a Potential Therapeutic Target in Multiple Myeloma. *Target Oncol.* 2018 Feb;13(1):39-47. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11523-017-0538-x>
 15. Ma T, Shi J, Liu H. Chimeric antigen receptor T cell targeting B cell maturation antigen immunotherapy is promising for multiple myeloma. *Ann Hematol.* 2019;98(4):813–22. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00277-018-03592-9>
 16. Wu C, Zhang L, Brockman QR, Zhan F, Chen L. Chimeric antigen receptor T cell therapies for multiple myeloma. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):120. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0823-5>
 17. Castella M, Fernández de Larrea C, Martín-Antonio B. Immunotherapy: A Novel Era of Promising Treatments for Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 15;19(11):3613. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms19113613>
 18. Timmers M, Roex G, Wang Y, Campillo-Davo D, Van Tendeloo VFI, Chu Y, et al. CAR-T Cell Therapy in Multiple Myeloma. *Front Immunol.* 2019 Jul 16;10:1613. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01613>
 19. Shah NN, Maatman T, Hari T, Johnson B. Multi Targeted CAR-T Cell Therapies. *Front Oncol.* 2019 Mar 12;9:146. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00146>
 20. Das RJ, Vernau L, Grupp SA, Barrett DM. Naïve T-cell deficits at diagnosis and after chemotherapy impair cell therapy potential in pediatric cancers. *Cancer Discov.* 2019 Apr;9(4):492-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1314>
 21. Garfall AL, Dancy EK, Cohen AD, Hwang WT, Fraietta JA, Davis MM, et al. T-cell phenotypes associated with effective CAR T-cell therapy in postinduction vs relapsed multiple myeloma. *Blood Adv.* 2019 Oct 8;3(19):2812-15. Disponible en: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000600>
 22. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Hudecek M, Pender B, Robinson E, et al. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci Transl Med.* 2016 Sep 7;8(355):355ra116. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8621>
 23. Oliva S, Troia R, D'Agostino M, Boccadoro M, Gay F. Promises and pitfalls in the use of PD-1/PD-L1 inhibitors in multiple myeloma. *Front Immunol.* 2018 Nov 27;9:2749. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02749>
 24. Sommer C, Boldajipour B, Kuo TC, Bentley T, Sutton J, Chen A, et al. Preclinical evaluation of allogeneic CAR T cells targeting BCMA for the treatment of multiple myeloma. *Mol Ther.* 2019 Jun 5;27(6):1126–38. Disponible en: doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.04.001

GLOSARIO

Acción de mejora	Pág 94	Hematología.....	Pág 172, 197
Acreditación	Pág 89	Hemólisis	Pág 99
ACTH.....	Pág 45	Hemostasia	Pág 181
ADN tumoral circulante	Pág 156	Homeostasis tisular.....	Pág 37
Alcance flexible.....	Pág 89	Hormona del crecimiento	Pág 58
Aldosterona.....	Pág 53	HPO	Pág 161
Aldosteronismo	Pág 53	HSC (Hiperplasia Suprarrenal Congénita) ...	Pág 139
Andrógenos	Pág 45	IGF-1.....	Pág 58
Antirretrovirales.....	Pág 84	Infección articular	Pág 186
ARN transferente	Pág 121	Informe de laboratorio	Pág 99
Artritis séptica	Pág 186	Inmuno-oncología	Pág 197
Bioinformática	Pág 161	Inmunoterapia.....	Pág 197
Biopsia líquida	Pág 154	Interacciones.....	Pág 84
Calidad.....	Pág 94	Iones	Pág 16
Cáncer Colorrectal.....	Pág 114	Lípidos	Pág 23
Cáncer	Pág 105	Metabolismo.....	Pág 23
Células tumorales circulantes	Pág 156	Mineralocorticoides	Pág 53
Ciclo de mejora	Pág 94, 99	Miopatía Mitocondrial	Pág 121
Citometría de Flujo	Pág 172	Mitocondriales.....	Pág 127
Coagulación.....	Pág 180	Mola hidatiforme	Pág 63
Cobre	Pág 133	Monitorización.....	Pág 77
Colestasis intrahepática del embarazo	Pág 70	<i>Mutation Cluster Region</i>	Pág 116
Coriocarcinoma.....	Pág 63	Orina	Pág 31
Cortisol.....	Pág 45	PCR digital.....	Pág 149
CYP21A2.....	Pág 139	Poliposis Adenomasas.....	Pág 116
Diabetes gestacional	Pág 70	Preeclampsia	Pág 70
Diagnóstico molecular.....	Pág 139	Secuenciación masiva	Pág 121, 161
Diagnóstico	Pág 192	Sedimento.....	Pág 31
Disfunción endotelial.....	Pág 37	Sistemático	Pág 31
Eje hipotálamo-hipofisiario.....	Pág 58	Titinopatías	Pág 149
Electrolitos	Pág 16	Tratamiento.....	Pág 127
Embriología humana.....	Pág 63	Urgencias.....	Pág 77, 181
ENAC.....	Pág 89	Variante.....	Pág 107
Endotelio.....	Pág 37		
Enfermedad celiaca	Pág 192		
Enfermedad de Wilson.....	Pág 133		
Ensayos.....	Pág 127		
Exoma.....	Pág 107, 149		
Fármacos.....	Pág 77, 84		
Genética	Pág 133		
Gluten	Pág 192		
Hematimetría	Pág 172		

