

CLIN12LAB

Libro de Sesiones de los Laboratorios Clínicos 2022



Editores

David Melero López

Fernando Calvo Boyero

Olga Nerea Coya Linares

Ana Elena López Jiménez

Editores de este volumen:

Olga Nerea Coya Linares, David Melero López, Fernando Calvo Boyero, Ana Elena 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/analisis-clinicos-bioquimica-clinica>

Imagen de Portada diseñada por Víctor Felipe Sanz Fernández

I.S.B.N.: 978-84-09-42147-3

Madrid (España), 2022



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 2022

Editores

Olga Nerea Coya Linares

David Melero López

Fernando Calvo Boyero

Ana Elena López Jiménez

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

LISTADO DE EDITORES

Olga Nerea Coya Linares
Laboratorio Central de la Comunidad de Madrid
Hospital Universitario Infanta Sofía, San Sebastián de los Reyes
Email: olganerea.coya@salud.madrid.org

David Melero López
Laboratorio Central de la Comunidad de Madrid
Hospital Universitario Infanta Sofía, San Sebastián de los Reyes
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

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

LISTADO DE AUTORES

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

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

Eva Barbón Alonso
Servicio de Análisis Clínicos
Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona

Eva Berruga Torres
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

Fernando Calvo Boyero
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

Nerea Castro Quismondo
Servicio de Hematología
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Olga Nerea Coya Linares
Laboratorio Central de la Comunidad de Madrid
Hospital Universitario Infanta Sofía, San Sebastián de los Reyes

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

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

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

Daniel Gil Alós
Servicio de Hematología
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

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

Marina Gómez Rosel
Servicio de Inmunología
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

Ilenia Liria González
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

Ángel Camilo López Regueiro
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

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

Leticia Martínez Alonso
Servicio de Análisis Clínico
Complejo Hospitalario Universitario de Vigo

Patricia Martínez Loredo
Servicio de Análisis Clínico
Complejo Hospitalario Universitario de Vigo

David Melero López
Laboratorio Central de la Comunidad de Madrid
Hospital Universitario Infanta Sofía, San Sebastián de los Reyes

Steven Abel Merchán Magallanes
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
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

Leticia Rodríguez Calviño
Servicio de Análisis Clínico
Complejo Hospitalario Universitario de Vigo

Laura Rubio Pérez

Servicio de Inmunología

Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Jon Sánchez Munárriz

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos

Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Esther Carolina Tamayo Hernández

Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos

Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Denis Zafra Torres

Servicio de Hematología

Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

PRÓLOGO

Un año más os presentamos una nueva edición de Clin12Lab, donde se agrupan sesiones clínicas de distintas unidades del Laboratorio Clínico, desde Bioquímica a Genética, pasando por Inmunología y Hematología.

Los temas tratados son muy variados, desde revisiones básicas de contenido hasta investigaciones punteras y de actualidad. Han participado como autores distintos residentes, facultativos e investigadores, que han conseguido con su predisposición, interés y trabajo unos capítulos que creemos serán de gran provecho y utilidad para el lector, ya sea para su trabajo en el día a día como para su ampliación de conocimiento sobre nuestro apasionante mundo donde desempeñamos nuestro trabajo diario, el Laboratorio Clínico.

Comenzamos este proyecto en 2019, con la idea de compartir todo el conocimiento generado en las sesiones que escribimos y presentamos periódicamente en nuestro servicio. Hemos sido firmes defensores de la difusión libre de todo el trabajo que realizamos, que en la mayoría de las ocasiones quedaba oculto en un cajón. Los comienzos siempre fueron duros, y este caso no es la excepción. Convencimos a nuestra apreciada jefa de servicio, Ana López, que como siempre, nos apoyó dándonos todos los recursos que pudo. Convencimos a nuestros compañeros de que nuestras sesiones eran muy interesantes, y debían ser proyectadas al exterior. Y entre tres personas conseguimos realizar todo el trabajo de edición, maquetación, corrección y puesta a punto de una publicación de más de 200 páginas.

Este proyecto además, habría sido imposible sin la colaboración de José Manuel Estrada, bibliotecario del Hospital, que desde un primer momento nos indicó cómo seguir los pasos para publicarlo, y nos dio unas buenas clases de formato Vancouver. Por otra parte tuvimos la suerte de tener a Víctor Sanz, que le dio un toque artístico al proyecto creando una portada que es envidia de cualquier *Nature* o *New England*. Por último, habría sido imposible sin nuestros compañeros del Hospital, especialmente del Servicio de Bioquímica/Análisis Clínicos, que se volcaron enviándonos material para dar un contenido de alto nivel a este libro. A todos, muchas gracias.

Esta andadura nos trajo al siguiente año una segunda edición, que mantuvo la ilusión de la anterior, y donde decidimos maquetar de una forma más profesional, haciendo capítulos a doble columna como en las revistas de más alto nivel. Jamás hubiéramos pensado que esto nos traería tantos dolores de cabeza, pero el resultado mereció la pena.

Este último año, siendo los tres especialistas decidimos continuar al mismo ritmo, volcándonos en la tercera edición, a pesar de nuestras múltiples obligaciones que nos han retrasado más de lo que hubiésemos deseado, y por lo que os pedimos disculpas.

Tras la publicación de estas tres ediciones consecutivas, creemos que es el momento de dejar este proyecto en manos de los grandes profesionales que dan lo mejor de sí mismos en la que fue, ha sido y será siempre nuestra casa, el Hospital Universitario 12 de Octubre. Es hora de dejar paso a otra generación de residentes que esperamos que retomen este proyecto con mucha ilusión y ganas, y que mantengan viva la llama del Laboratorio Clínico. Muchas gracias a todos los que habéis participado estos años para que este proyecto naciera, avanzara y madurara en cada edición.

Los editores

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BLOQUE I SESIONES DE BIOQUÍMICA CLÍNICA	14
PROTEÍNA AMILOIDE A SÉRICA. AUTORES: LAURA CARRASCO PARRÓN; FERNANDO CALVO BOYERO	15
UTILIDAD DEL LABORATORIO EN EL DIAGNÓSTICO DE SEPSIS. AUTORES: ALBA FERNÁNDEZ DEL POZO, CECILIA CUETO-FELGUEROSO OJEDA.....	21
LITIASIS URINARIA. AUTORES: EVA BARBÓN ALONSO¹; DANIEL PÁRRAGA GARCÍA²	29
LÍQUIDOS BIOLÓGICOS: LÍQUIDOS SEROSOS Y LÍQUIDO SINOVIAL. AUTORES: MAIALEN PALOMINO ALONSO*, YLENIA PÉREZ ARNAIZ*, ALBA FERNÁNDEZ DEL POZO.....	36
BIOMARCADORES EN COVID-19: SUPAR (RECEPTOR SOLUBLE DEL ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO TIPO UROQUINASA). AUTORES: EVA BERRUGA TORRES, ELENA ANA LÓPEZ JIMÉNEZ.....	43
NUEVOS MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR. AUTORES: IRENE GONZÁLEZ MARTÍNEZ; CECILIA CUETO-FELGUEROSO OJEDA	49
MONITORIZACIÓN DE FÁRMACOS. AUTORES: CELIA AMIL MANJÓN, FERNANDO CALVO BOYERO	56
MARCADORES TUMORALES. AUTORES: IRENE GONZÁLEZ MARTÍNEZ, ADRIÁN GONZÁLEZ QUINTANA, ILENIA LIRIA GONZÁLEZ	63
GLICOSILACIÓN DE LA TRANSFERRINA: UTILIDAD CLÍNICA DEL PERFIL SÉRICO DE SUS ISOFORMAS. AUTORES: STEVEN ABEL MERCHÁN MAGALLANES¹, ELENA ANA LÓPEZ JIMÉNEZ².	73
USO DE LA BETA2-TRANSFERRINA Y OTROS MARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO DE FÍSTULAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO. AUTORES: ESTHER CAROLINA TAMAYO HERNÁNDEZ, DAVID MELERO LÓPEZ	78
DESAFÍOS EN EL LABORATORIO CLÍNICO: MACROPROLACTINA. AUTORES: LETICIA MARTÍNEZ ALONSO, LETICIA RODRÍGUEZ CALVIÑO, PATRICIA MARTÍNEZ LOREDO.....	84
ETIL GLUCURÓNIDO EN ORINA COMO MARCADOR DEL CONSUMO DE ALCOHOL. AUTORES: PILAR DUARTE GARCÍA, ÁNGEL CAMILO LÓPEZ REGUEIRO, DAVID MELERO LÓPEZ	90
PATOLOGÍA SUPRARRENAL. AUTORES: ILENIA LIRIA GONZÁLEZ, SILVIA DÍAZ DÍAZ, ADRIÁN GONZÁLEZ QUINTANA.....	99
ALTERACIONES NEUROLÓGICAS. AUTORES: MAIALEN PALOMINO ALONSO; ALBA FERNÁNDEZ DEL POZO	109
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: FISIOPATOGENIA Y BIOMARCADORES. AUTORES: YLENIA PÉREZ ARNAIZ, ALBA FERNÁNDEZ DEL POZO	119
ENFERMEDADES DE DEPÓSITO LISOSOMAL. AUTORES: YLENIA PÉREZ ARNAIZ, ILENIA LIRIA GONZÁLEZ	124
BLOQUE II SESIONES DE CALIDAD.....	131
ESPECIFICACIONES DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO. AUTORES: DANIEL PÁRRAGA GARCÍA, OLGA NEREA COYA LINARES.....	132
DISTINTOS MODELOS DE ACREDITACIÓN EN INSTITUCIONES SANITARIAS EN TODO EL MUNDO. AUTORES: DANIEL PÁRRAGA GARCÍA, OLGA NEREA COYA LINARES.....	137

DELTA CHECK: MONITORIZACIÓN DE RESULTADOS. AUTORES: JON SÁNCHEZ MUNÁRRIZ; CECILIA CUETO-FELGUEROSO OJEDA	144
BLOQUE III SESIONES DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	150
INESTABILIDAD DEL ADN: MUTACIONES DINÁMICAS. AUTORES: JON SÁNCHEZ MUNÁRRIZ, DAVID CUEVAS GÓMEZ, ANA ARTECHE LÓPEZ.....	151
SÍNDROMES DE DELECIÓN ÚNICA EN EL ADN MITOCONDRIAL. AUTORES: FERNANDO CALVO BOYERO, ADRIÁN GONZÁLEZ QUINTANA, MIGUEL ÁNGEL MARTÍN CASANUEVA	156
ATROFIA ÓPTICA DOMINANTE: PAPEL DE OPA1 Y REPERCUSIÓN MITOCONDRIAL. AUTORES: MAIALEN PALOMINO ALONSO, ALBERTO BLÁZQUEZ ENCINAR, MIGUEL ÁNGEL MARTÍN CASANUEVA	162
BLOQUE IV SESIONES DE HEMATOLOGÍA.....	172
ESTUDIO DE ALTERACIONES DE LA SERIE MIELOIDE: NEUTROPENIAS Y NEOPLASIAS MIELOIDES. AUTORES: LAURA CARRASCO PARRÓN, SANDRA GÓMEZ ROJAS	173
HEMOSTASIA Y COAGULACIÓN. AUTORES: DAVID CUEVAS GÓMEZ¹, SANDRA GÓMEZ ROJAS²	183
ESTUDIO DEL ALARGAMIENTO DEL TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADO (TTPA). AUTORES: DANIEL GIL ALÓS, DENIS ZAFRA TORRES, NEREA CASTRO QUISMONDO.....	190
BLOQUE V SESIONES DE INMUNOLOGÍA	196
VASCULITIS ASOCIADA A ANTICUERPOS ANTI-CITOPLASMA DE NEUTRÓFILO. AUTORES: EVA BARBÓN ALONSO¹, DANIEL PÁRRAGA GARCÍA²	197
BCMA SOLUBLE COMO BIOMARCADOR NO INVASIVO EN NEOPLASIAS DE CÉLULAS B. AUTORES: LAURA DÍEZ ALONSO, LAURA RUBIO PÉREZ, MARINA GÓMEZ ROSEL.....	206

BLOQUE I

SESIONES DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

PROTEÍNA AMILOIDE A SÉRICA

Autores: Laura Carrasco Parrón; Fernando Calvo Boyero

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

Palabras clave: Amiloide A sérico, Reactantes de fase aguda

INTRODUCCIÓN

La respuesta de fase aguda refleja la inflamación tanto aguda como crónica en curso y se presenta en una amplia variedad de condiciones inflamatorias como infecciones, trauma, cirugías, quemaduras, neoplasias, enfermedades reumáticas inflamatorias y ciertas reacciones inmunes a drogas.

Dentro de los cambios de fase aguda encontramos cambios en las concentraciones de proteínas plasmáticas, conocidas como proteínas de fase aguda y cambios metabólicos, fisiológicos y nutricionales que se presentan al cabo de unas horas tras el estímulo inflamatorio.

Las proteínas de fase aguda son aquellas cuya concentración plasmática aumenta o disminuye al menos un 25% durante la inflamación y, pese a su nombre, también se asocian con procesos inflamatorios crónicos.

Las que se incrementan se conocen como proteínas de fase aguda positivas o “reactantes positivos” y son producidas por los hepatocitos bajo el estímulo de citoquinas IL1 β , IL-6, IL-18 o TNF, secretadas por monocitos activados, macrófagos o las células endoteliales; estas citoquinas proinflamatorias son inductoras de una reacción multiorgánica que involucra el hígado, el sistema nervioso central, el sistema vascular, la médula ósea y el sistema inmune.

Las proteínas de fase aguda se clasifican en tres grupos funcionales: las que participan en las defensas del huésped, las inhibidoras de serina proteasas y las transportadoras con actividad antioxidante. Sus funciones son el reconocimiento y eliminación de patógenos, limitar el daño de los tejidos del huésped por enzimas proteolíticas y metabolitos de oxígeno producidos durante la inflamación aguda y reducir la reacción inflamatoria.

Las principales proteínas de fase aguda positivas son: la proteína C reactiva (PCR), algunos componentes del complemento sérico, especialmente C3, el fibrinógeno, el amiloide A sérico (AAS), la alfa 1 antitripsina, la ceruloplasmina y la haptoglobina. Sólo unas horas después del estímulo inicial (~4-6 h), los niveles séricos de PCR y AAS aumentan más de 1000 veces en estados inflamatorios severos e infecciones. La cinética de los cambios en las concentraciones de PCR y AAS es similar; sin embargo, los niveles de AAS disminuyen más lentamente tras la respuesta inicial.

Las concentraciones séricas de algunos componentes del complemento, haptoglobina y fibrinógeno aumentan 2 a 5 veces con la inflamación, alcanzando un pico después de 10-20 horas. Las altas concentraciones plasmáticas de fibrinógeno dan lugar a un aumento en la velocidad de sedimentación globular (VSG).

Por el contrario, las concentraciones de las proteínas de fase aguda negativas o “reactantes negativos” como la prealbúmina, albúmina, apolipoproteína-A (apoA-I), antitrombina III, proteína S y la transferrina disminuyen con la inflamación.

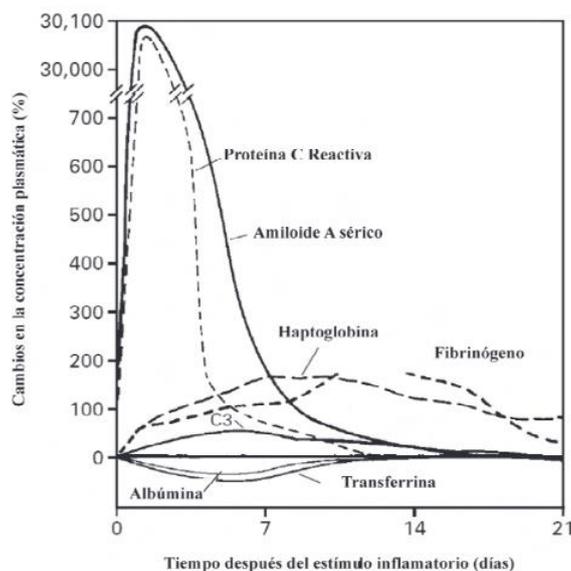


Figura 1. Cambio en las concentraciones plasmáticas de algunas proteínas de fase aguda tras el estímulo inflamatorio. Tomado de: González Naranjo, 2010.

Entre los reactantes de fase aguda más utilizados en la práctica clínica encontramos:

- VSG: Se eleva dentro de las 24-48 horas del inicio de la inflamación y retrocede lentamente con resolución. Una VSG extremadamente elevada (>100 mm/hora) presenta una alta especificidad para infección, malignidad o arteritis.
- PCR: Comienza a aumentar después de 12-24 horas y alcanza su punto máximo dentro de 2 a 3 días. Se han visto bajos niveles de elevación de la PCR con valores entre 2 y 10 mg/L medido por un ensayo de PCR ultrasensible en estados “inflamatorios metabólicos” no infecciosos como isquemia cardiaca, uremia o tabaquismo.
- PCT: Detectable dentro de 3-4 horas y picos dentro de 6-24 horas. Se eleva principalmente en procesos infecciosos y es más sensible y específico que la PCR para distinguir causas bacterianas de causas de inflamación no infecciosas.

CARACTERÍSTICAS DE AAS

• Evolución

La biología de la proteína amiloide A sérica (SAA) tuvo un descubrimiento indirecto. El término "amiloide" se refería originalmente al almidón que se encuentra en las plantas y es un carbohidrato. El término "amiloidosis" fue utilizado en el siglo XIX por patólogos para describir unas estructuras aparentemente amorfas e infiltrantes encontradas *post mortem* en riñón, hígado y corazón. Estudios posteriores mostraron que estos depósitos comprendían proteínas y la microscopía electrónica reveló matrices de microfibrillas.

Las proteínas derivadas de fibrillas aisladas por diferentes laboratorios diferían ligeramente en longitud de 68 a 76 aminoácidos (aa), pero compartían residuos N-terminales comunes. Estos se denominaron "AA" ("amiloide A"). Los anticuerpos preparados contra estas proteínas identificaron una proteína sérica pequeña (104 aa) que, más tarde, se demostró que era su precursora. Debido a que esta fue la primera proteína sérica no inmunoglobulina identificada como precursora de los depósitos de enfermedad amiloide, se la denominó "amiloide A sérico". Posteriormente se vio que el AAS es un componente de la respuesta de fase aguda.

El AAS es el precursor circulante de la proteína A amiloide, el componente fibrilar de los depósitos de amiloide en la amiloidosis secundaria.

• Características principales

El amiloide A sérico (AAS) es, al igual que la proteína C reactiva (PCR), una proteína de fase aguda y se puede utilizar como marcador de seguimiento de diagnóstico, pronóstico o terapia para muchas enfermedades. En la mayoría de los casos, la concentración sérica de AAS correlaciona con la de proteína C reactiva (PCR), aunque la proteína amiloide alcanza valores mayores y puede responder más rápidamente.

El AAS es una apolipoproteína que está estrechamente asociada con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y promueve la exportación de colesterol de las células inflamatorias.

Además, el AAS es un potente agente quimiotáctico para los leucocitos, induce la secreción de IL-18, y estimula la angiogénesis y la expresión de metaloproteinasas de matriz, a través de las cuales promueven la remodelación tisular. También se ve implicado en cambios locales en la aterosclerosis, metástasis del cáncer e inflamación pulmonar.

– Síntesis de AAS

La proteína amiloide A sérica se sintetiza principalmente en el hígado en respuesta a citoquinas liberadas por los macrófagos tras un estímulo de fase aguda tal como una infección o daño físico, reacciones inflamatorias y cáncer.

El aumento resultante en la producción de AAS en varios tejidos ha sido un biomarcador clínico bien establecido para los trastornos inflamatorios. Se cree ampliamente que las citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , así como los glucocorticoides, desempeñan funciones importantes en la expresión hepática de AAS1 y AAS2 durante la respuesta de fase aguda. La regulación

transcripcional es la principal responsable de la inducción marcada de AAS en la respuesta de fase aguda.

– Cinética de AAS

Aunque se han encontrado un total de seis isoformas de AAS, la AAS1 y la AAS2, son las que se hallan principalmente en el suero humano durante la inflamación, mientras que la AAS4 (también denominada AAS constitutiva o C-AAS) apenas varía a lo largo de este proceso.

Una vez liberada a la circulación, la AAS se asocia rápidamente con la fracción HDL, pudiendo aumentar su concentración, durante las primeras 24-48 horas del estímulo agudo hasta más de quinientas veces, permaneciendo elevada mientras ocurre el proceso inflamatorio crónico.

Al igual que la PCR, los niveles de AAS aumentan a las pocas horas después del estímulo y la magnitud de tal incremento puede ser mayor que el de la PCR. El orden de magnitud del aumento de los niveles de AAS varía considerablemente, de 10 a 100 veces durante eventos inflamatorios limitados a un aumento de 1000 veces durante infecciones bacterianas graves y exacerbaciones agudas de enfermedades inflamatorias crónicas.

En concentraciones bajas, al comienzo de una respuesta inflamatoria, AAS induce quimiocinas o enzimas que degradan la matriz a través de receptores tipo Toll y funciona como activador y quimioatrayente a través de un receptor acoplado a proteína G. Cuando persiste un estímulo infeccioso o inflamatorio, el hígado continúa produciendo más AAS para convertirse en un agente antimicrobiano al funcionar como una opsonina directa de las bacterias o por interferencia con la infección viral de las células huésped. Por lo tanto, AAS regula la inmunidad innata y adaptativa y esta información puede ayudar a diseñar mejores medicamentos para tratar enfermedades específicas.

– Niveles en suero

En la revisión de Mieke De Bucke¹, se reportan resultados bastante interesantes respecto a los valores de AAS en suero. El valor normal en individuos sanos se encuentra entre 1-2 mg/L.

En los individuos enfermos, la concentración de AAS varía, desde 10 mg/L hasta 500 mg/L, incluso por encima de 1000 mg/L. En general, bajo condiciones patológicas, la concentración de AAS se va a encontrar por encima de 10 mg/L.

También se han comparado los niveles de AAS en suero de individuos sanos con el de individuos enfermos y se observa la elevación de la concentración de AAS en varias enfermedades como infecciones agudas virales o bacterianas, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, neoplasias, también en trauma y en cirugía. Es llamativo que en los pacientes con tumores benignos no se vieron aumentados significativamente los niveles de AAS respecto a los individuos sanos. Sin embargo, sí aumenta conforme progresa el cáncer. Lo mismo se observa en pacientes con artritis reumatoide y osteoartritis, cuyo valor de AAS aumenta junto con la severidad de la enfermedad.

IMPLICACIÓN DE AAS

• Amiloidogénesis

Las amiloidosis constituyen un grupo de enfermedades definidas por una acumulación extracelular de una sustancia patológica correspondiente a la vía final común del metabolismo anormal de ciertas proteínas. En presencia de una amiloidosis, es necesario un enfoque diagnóstico riguroso y sistemático para establecer su tipo concreto: inmunoglobulínico, inflamatorio, hereditario o senil. Existen pocos o ningún signo clínico específico de la amiloidosis, aunque la enfermedad es una afección multisistémica y, por lo tanto, puede afectar a casi todos los órganos.

Una vez sospechado el diagnóstico clínico de amiloidosis, debe realizarse el diagnóstico histológico.

Conforme a la clasificación bioquímica, pueden observarse tres grandes variedades de amiloidosis generalizada y, por lo tanto, debe pensarse sistemáticamente en ellas: la amiloidosis AL (de cadenas ligeras), la amiloidosis AA (amiloide A) y la amiloidosis ATTR (amiloidosis de la transtiretina senil), tanto si se trata de la forma hereditaria como de la forma silvestre "senil". Para la caracterización de las amiloidosis generalizadas, es necesario estudiar los anticuerpos antiproteína AA, anticadenas ligeras de inmunoglobulinas κ y λ y anti-TTR, que reconocen la mayoría de depósitos amiloides.

La amiloidosis tipo AA, también conocida como amiloidosis inflamatoria, es una complicación de las condiciones inflamatorias crónicas y se caracteriza por el depósito de fibrillas amiloides insolubles en los órganos y tejidos afectados. La proteína amiloide A (AA) es principalmente un producto de degradación de la fase aguda AAS1.

En este sentido, la amiloidogénesis no es exactamente una función de AAS1 *per se*, sino la consecuencia de la producción excesiva y el procesamiento aberrante de AAS1. El AA fibrilar deriva principalmente de AAS1 circulante, que se disocia de HDL antes de su conversión en fibrillas amiloides. Este proceso ocurre a través de una interacción con el heparán sulfato, un componente glicosaminoglicano de la matriz extracelular.

Un estudio reciente acerca de la estructura de AAS1 ha identificado un sitio de unión superpuesto para HDL y heparina, lo que explica el efecto del heparán sulfato en la disociación de AAS1 de HDL antes de su conversión en fibrillas amiloides².

Sin embargo, la base estructural de la amiloidosis AA sigue siendo en gran parte desconocida. El monómero SAA1.1 muestra cuatro hélices α , que se asemejan parcialmente al haz de cuatro hélices de ApoE. El parecido topológico de SAA con ApoE es interesante porque ambos se asocian con HDL y plantea la cuestión de si comparten un mecanismo común en la unión de glicosaminoglicanos y HDL.

• Remodelación de HDL y metabolismo de lípidos

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) tienen como función transportar el exceso de colesterol desde los tejidos hacia el hígado, para ser excretado; y de este modo contribuyen al control de las enfermedades cardiovasculares. Además, las HDL pueden modular la respuesta inmune, por

sus propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y anti-apoptóticas, entre otras.

A nivel celular, las HDL pueden modificar las balsas lipídicas, las cuales son determinantes en la activación de la respuesta inmune frente a patógenos o agentes extraños. En la sepsis, por ejemplo, las HDL participan mediando la eliminación del lipopolisacárido (LPS) a través de su captura y posterior eliminación en el hígado; esto conlleva a una modulación negativa de la expresión del TLR4, principal receptor del LPS. También se ha reportado que las HDL modulan la respuesta inflamatoria a través de la regulación de la activación de la cascada del complemento y la expresión de pentraxina 3.

Finalmente, la función y los niveles de las HDL se han encontrado particularmente alterados en algunas patologías infecciosas, aterosclerosis y sepsis, lo que se ha asociado con el progreso o la severidad de la enfermedad.

Durante la respuesta inflamatoria aguda los niveles y la composición de las HDL se ven afectados por la acción de algunas citoquinas y moléculas liberadas durante los procesos inflamatorios. En este sentido, citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6 disminuyen la expresión de ApoA-I e inducen la expresión de la proteína amiloide A sérica, la cual cambia la composición de las HDL, afectando su capacidad antiinflamatoria y antioxidante. SAA comprende hasta el 87% del contenido total de proteína HDL. Esto modula las propiedades metabólicas de HDL, pero no cambia la medición del colesterol HDL. Se cree que la presencia de SAA en HDL convierte el HDL ateroprotector en HDL disfuncional.

Se ha reportado que durante esta fase hay un incremento en la actividad de PLTP (proteínas de transferencia de fosfolípidos) y una disminución en la actividad de LCAT, lo que lleva a una disminución de las HDL maduras.

Otra alteración que se ha evidenciado es que la unión de AAS a HDL aumenta su afinidad por los macrófagos, mientras que la afinidad de unión por los hepatocitos disminuye.

- Riesgo cardiovascular y aterosclerosis

Muchas de las funciones asignadas a AAS son relevantes para la aterogénesis, incluida la promoción de la quimiotaxis, reduciendo la capacidad antiinflamatoria de HDL e influir en la retención de lipoproteínas en la pared vascular. La literatura reciente muestra que AAS activa el inflamasoma NLRP3, altera la función vascular, afecta la función HDL y aumenta la trombosis³.

Por tanto, la inflamación aguda o crónica puede conducir al desarrollo y/o progresión de la aterosclerosis y otras enfermedades vasculares, en parte mediante la inducción de SAA. Al aumentar rápidamente la inflamación en las arterias coronarias, las infecciones agudas pueden desencadenar la desestabilización y la posible rotura de placas vulnerables.

La aterosclerosis en una inflamación crónica en la que el AAS está moderadamente elevado. La mayoría de estudios in vivo en ratones demuestran que el AAS está asociado con el incremento de aterosclerosis en etapas tempranas de la aterogénesis, razón por la que los niveles de AAS en plasma

han sido ampliamente empleados como biomarcador para caracterizar la aterosclerosis.

● **Patogenia del tumor**

Se han investigado los niveles aumentados de AAS en suero en varias neoplasias malignas humanas, pero hasta la fecha no se ha establecido una perspectiva coherente. Un meta-análisis revisó sistemáticamente la asociación entre los niveles de AAS y los distintos tipos de cáncer. Los niveles altos de AAS circulantes se asociaron notablemente con el aumento de riesgo de cáncer en tumores de células escamosas esofágicas, de ovario, mama, pulmón, riñón y gástrico. Además, este estudio encontró que las concentraciones de AAS aumentaron con la gravedad de las etapas del cáncer⁴.

AAS1 y AAS4 se expresan altamente en carcinomas de cuello uterino y, por lo tanto, pueden servir como biomarcadores para este tipo de cáncer⁴.

En pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas que se someten a terapia con inhibidores de la tirosina quinasa del receptor de EGF, el aumento del nivel de expresión de AAS1 en plasma sirve como indicador de mal pronóstico. Asimismo, se ha establecido una correlación entre la expresión de AAS1 y un mal resultado clínico en pacientes con carcinoma de células renales convencional².

También se ha observado que, un miembro de la familia AAS, AAS3, facilita la metástasis de células tumorales al tejido pulmonar a través de un proceso dependiente de AAS3-TLR4 que favorece un estado similar a la inflamación denominado fase de premetástasis.

● **Patogénesis de la infección por VHC**

La infección por el virus de la Hepatitis C representa uno de los grandes problemas de salud en todo el mundo. Actualmente, aproximadamente 70 millones de personas en el mundo están infectadas por el VHC. Una vez infectado, 8 de cada 10 individuos desarrollan una infección crónica. Los pacientes con enfermedad crónica, desarrollan fibrosis hepática y ocasionalmente esto desemboca en cirrosis y carcinoma hepatocelular. De hecho, la hepatitis C crónica es una de las principales indicaciones para trasplante hepático.

El VHC activa múltiples vías inflamatorias desencadenando la expresión de citoquinas inductoras de AAS. Las proteínas de VHC son ligandos de los TLR. La activación de los TLR en monocitos y macrófagos conduce a la expresión de citoquinas inflamatorias como IL-1β, IL-6 y TNF-α. Se han identificado varias vías a través de las cuales VHC activa el inflammasoma. En primer lugar, las proteínas de VHC son reconocidas por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y esto activa la señal 1 del inflammasoma, lo que lleva a la producción de IL-1 e IL-18. En segundo lugar, el ARN del VHC muestra un efecto directo sobre la activación del inflammasoma en macrófagos. En tercer lugar, la exposición de los macrófagos al VHC induce la expresión de CCL5 y TNF-α, que contribuyen a la activación del inflammasoma en las células hepáticas.

El virus de la hepatitis C (VHC) regula al alza las citoquinas inductoras de AAS. En consonancia con esto, un segmento de individuos con infección crónica presenta niveles aumentados de AAS en circulación. Incluso se ha propuesto

que el AAS sea un biomarcador potencial para evaluar la eficacia del tratamiento y el curso de la enfermedad.

La eliminación de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) se ha asociado con una fuerte respuesta de células T ampliamente dirigida. La activación de las células T por las proteínas del VHC da como resultado la producción de citoquinas solubles, que a su vez inducen varias proteínas de fase aguda, incluido el amiloide A sérico. Se ha visto que AAS inhibe la replicación del VHC in vitro al bloquear la entrada del virus en los hepatocitos. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que los niveles de AAS medidos durante las primeras fases de la terapia contra el VHC puedan predecir el éxito del tratamiento antiviral⁵.

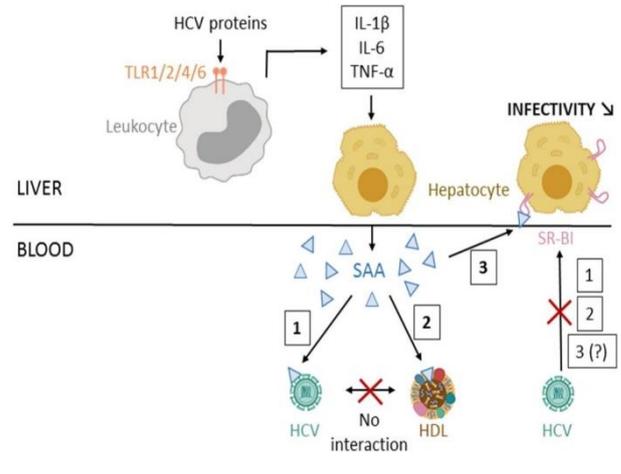


Figura 2. Citoquinas y AAS en la patogénesis del VHC. Tomado de: Abouelasrar *et al.*, 2019.

Sin embargo, la actividad biológica modulada por AAS comprende angiogénesis, reclutamiento de leucocitos, liberación de metaloproteinasas y polarización de macrófagos. Todo esto lleva al daño hepático y la inflamación crónica, que da lugar a la fibrosis hepática y la tumorigénesis.

Se han comparado en modelos animales los niveles de AAS con los de otros marcadores de daño hepático como AST o ALT. La elevación de AAS es mucho mayor que la de las otras dos enzimas hepáticas y, además, se ve una elevación temprana de AAS, sugiriendo su utilidad como marcador precoz de inflamación hepática. Por el contrario, se observan concentraciones menores de AAS en plasma en pacientes con fibrosis hepática avanzada, por lo que esto nos permitiría diferenciar entre pacientes con fibrosis hepática leve y avanzada⁵.

● **Monitorización de sepsis neonatal**

La sepsis neonatal de aparición temprana (EONS) en la unidad de cuidados intensivos neonatales es muy mortal y puede provocar secuelas graves a largo plazo. El diagnóstico oportuno y el uso apropiado de antibióticos son particularmente importantes para reducir la mortalidad y morbilidad relacionadas con la sepsis neonatal.

En las últimas décadas se ha visto la aparición de múltiples biomarcadores para el control de la eficacia de los antibióticos empleados en sepsis neonatal. Estos incluyen marcadores de superficie, reactivos de fase aguda,

citocinas y quimiocinas. Estos biomarcadores objetivos como PCR, AAS, PCT e IL-6 son los más utilizados en la clínica.

La PCR sigue siendo el indicador de diagnóstico y seguimiento más utilizado para la sepsis, con una especificidad del 94,8% y una sensibilidad del 67,1%. La PCT, por su parte, presenta el valor predictivo negativo más alto (87-100%) para las infecciones bacterianas graves en los recién nacidos. Finalmente, AAS tiene alta precisión para la detección precoz de infecciones en recién nacidos, con una especificidad del 95% y una sensibilidad del 82%, y se correlaciona negativamente con la mortalidad neonatal. Las citocinas y quimiocinas como la interleucina-6 (IL-6) se han considerado inadecuadas debido a su corta vida media.

En el estudio de Liu C. Zhang *et al.*, el seguimiento clínico real de la evolución de la enfermedad en neonatos se realizó cada 12-24 horas dentro de las 72 horas posteriores al nacimiento y cada 24-48 horas después de que la condición se estabilizó tras las 72 horas. La PCR tuvo un valor diagnóstico alto en cada intervalo, con un AUC superior a 0,9. El AAS tuvo un rendimiento alto a las 24-48 horas (con un AUC superior a 0,9), un valor diagnóstico moderado en los intervalos de 12-24 horas y 48-96 horas (con AUC de 0,7-0,9), pero no tuvo precisión diagnóstica en el intervalo de 96-144 horas (con un AUC de 0,5); La PCT tuvo un valor diagnóstico alto a intervalos de 12-24 y 24-48 horas (con un AUC superior a 0,9) y moderado a las 48-96 horas (con AUC de 0,7-0,9), pero no tuvo valor diagnóstico a las 96-144 horas (con un AUC de 0,517) ⁶.

Por lo tanto, durante la fase aguda de la inflamación, el AAS aumenta rápidamente, pero cuando el recién nacido mejora después de que el tratamiento con antibióticos ha entrado en vigor, el AAS también disminuye rápidamente, por lo que puede ser sensible para reflejar el nivel de eficacia antibiótica y los cambios en la condición de los recién nacidos.

● Pronóstico COVID-19

Un estudio de Huan Li *et al.* evaluó el AAS como biomarcador de severidad y pronóstico de COVID-19 en 132 pacientes con la enfermedad en Wuhan⁷. Estudiaron las variaciones en AAS, PCR, PCT, WBC, linfocitos, plaquetas, imagen TC y la progresión de la enfermedad. Los pacientes tuvieron incrementos significativos en los niveles de AAS y PCR mientras el recuento de linfocitos caía y otros parámetros como PCT, WBC y plaquetas, se mantenían en rangos normales.

La curva ROC del análisis sugiere que AAS/Linfocitos, PCR, AAS y el recuento de linfocitos son valorables en la evaluación de la enfermedad severa por COVID-19 y permite distinguir los pacientes graves de los leves (Figura 3)

Aquellos pacientes cuyos niveles de AAS disminuían de forma constante, tuvieron un mejor pronóstico comparado con aquellos cuyo AAS seguía en aumento. El nivel inicial de AAS se correlaciona positivamente con los cambios dinámicos de las tomografías computarizadas en serie. Los pacientes con un nivel inicial de AAS más alto tienen más probabilidades de tener imágenes de TC peores. En definitiva, llegaron a la conclusión de que el AAS y los linfocitos son marcadores sensibles para evaluar la gravedad y el pronóstico de COVID-19. La monitorización de los

cambios dinámicos de AAS combinado con imágenes de TC, podría ser valioso en el diagnóstico y tratamiento de COVID-19.

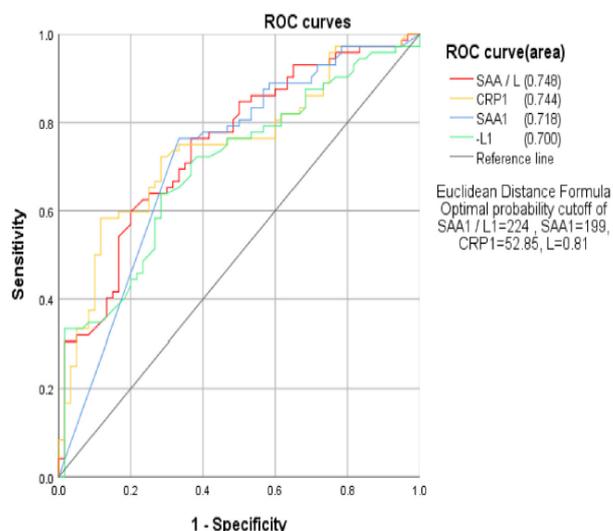


Figura 3. Curva ROC del análisis de distintos biomarcadores en la evaluación de la enfermedad COVID-19. Tomado de: Huan Li *et al.*, 2020.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. Buck M, Gouwy M, Wang J, Snick J, Opdenakker G, Struyf S, et al. Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults. *Curr Med Chem.* 2016;23(17):1725-55.
2. Lu J, Yu Y, Zhu I, Cheng Y, Sun PD. Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(14):5189-94.
3. Shridas P, Tannock LR. Role of serum amyloid A in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2019 Aug;30(4):320-25.
4. Zhou J, Sheng J, Fan Y, Zhu X, Tao Q, He Y, Wang S. Association between serum amyloid A levels and cancers: a systematic review and meta-analysis. *Postgrad Med J.* 2018 Sep;94(1115):499-507.
5. Abouelasrar Salama S, Lavie M, De Buck M, Van Damme J, Struyf S. Cytokines and serum amyloid A in the pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Cytokine Growth Factor Rev [Internet].* 2019;50(Aug 2019):29-42.
6. Liu C, Zhang Y, Shang Y, Fang C, He Q, Xie L. Clinical values of common biomarkers for efficacy monitoring of antibiotics in early-onset neonatal sepsis. *Transl Pediatr.* 2020;9(5):669-76.
7. Li H, Xiang X, Ren H, Xu L, Zhao L, Chen X, et al. Serum Amyloid A is a biomarker of severe Coronavirus Disease and poor prognosis. *J Infect [Internet].* 2020;80(6):646-55.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: Prospective study and updated meta-analyses. *Br Med J.* 2000;321(7255):199-204.
- Georgin-Lavialle S, Buob D, Grateau G. *Amiloidosis.* Barcelona: Elsevier Masson; 2019.
- Getz GS, Krishack PA, Reardon CA. Serum amyloid A and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27(5):531-535.
- Gonzalez LA, Restrepo FM. Evaluación de la inflamación en el laboratorio. *Rev Colomb Reum.* 2010;17(1):35-47.
- Gschwantler M, Dulic M, Dulic-Lakovic E, Schwarzer R, Rieder F, Graninger W, et al. Increased levels of serum amyloid a during the early phase of hepatitis C treatment with interferon are associated with sustained virologic response - A pilot study. *J Gastrointest Liver Dis.* 2014;23(1):101-2.
- Hansen MT, Forst B, Cremers N, Quagliata L, Ambartsumian N, Grum-Schwensen B, et al. A link between inflammation and metastasis: Serum amyloid A1 and A3 induce metastasis, and are targets of metastasis-inducing S100A4. *Oncogene.* 2015;34(4):424-35.
- Marín-Palma D, Taborda NA, Urcuqui-Inchima S, Hernández JC. Inflamación y respuesta inmune innata: participación de las lipoproteínas de alta densidad. *latreia.* 2017;30(4):423-35.
- Rodríguez-Pérez JC, Rodríguez-Esparragón F, Cañas-Pedrosa A. Biomarkers and vascular lesions. *Dial y Traspl.* 2009;30(1):18-20.

UTILIDAD DEL LABORATORIO EN EL DIAGNÓSTICO DE SEPSIS

Autores: Alba Fernández del Pozo; Cecilia Cueto-Felgueroso Ojeda

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

Palabras clave: Sepsis, shock, PCT, MDW

INTRODUCCIÓN

La sepsis es una patología compleja y de difícil manejo clínico con una alta morbimortalidad.

Se estima que afecta a alrededor de 50 millones de personas al año, siendo la responsable de más de 11 millones de muertes anuales. En España, la incidencia actual se sitúa en torno a los 2-7 casos por cada 100.000 habitantes/día, siendo además la primera causa de ingreso en unidades de cuidados intensivos (UCI) en nuestro país y la primera causa de muerte hospitalaria por delante del ictus o el infarto de miocardio. Todo ello lo convierte en un problema sanitario de gran envergadura que requiere y consume gran cantidad de recursos.

Para su abordaje es necesario un diagnóstico rápido y fiable con un elevado grado de colaboración entre los distintos servicios médicos implicados. De ello va a depender la evolución del paciente y en definitiva su supervivencia.

• Definiciones y evolución de conceptos

En el año 1992 se celebró la primera conferencia consenso sobre sepsis liderada por la Sociedad de Medicina de Cuidados Críticos (SCCM) y *American College of Chest*. En ella se establecieron los siguientes conceptos en relación con la sepsis (Figura 1):

- Infección:

Respuesta inflamatoria que se lleva a cabo en el huésped ante la invasión y multiplicación de agentes patógenos en los tejidos de un organismo (Figura 2).

- Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS):

Se trata de un síndrome generalizado que se caracteriza por la presencia de al menos dos de los signos y síntomas clínicos de inflamación a continuación citados, sin que se requiera demostrar por cultivo microbiológico la presencia de una infección bacteriana:

- Temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ o $<35^{\circ}\text{C}$.
- Frecuencia cardíaca >90 latidos por minuto.
- Frecuencia respiratoria >20 respiraciones por minuto o $\text{pCO}_2 <32$ mmHg, o necesidad de ventilación mecánica.
- Leucocitos > 12.000 o <4.000 por mm^3 o $>10\%$ de cayados.

- Sepsis:

Respuesta inflamatoria sistémica a un estímulo infeccioso documentado clínica y/o microbiológicamente.

Relationship of Infection, SIRS, Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock

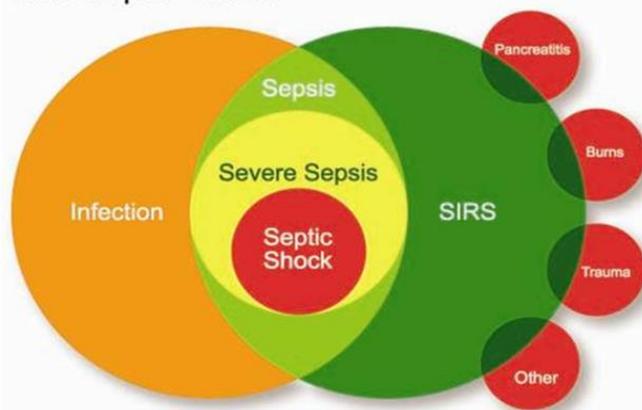


Figura 1. Relación entre los distintos conceptos. Tomado de: Bone *et al.*, 1992.

- Sepsis grave:

SIRS con causa infecciosa probada, asociada con al menos dos de los criterios de alteración de la perfusión tales como acidosis láctica, oliguria, encefalopatía hipoxémica, coagulación intravascular diseminada o hipotensión arterial (transitoria o persistente).

- Shock séptico:

Sepsis asociada a hipotensión persistente y alteraciones de la perfusión a pesar de la adecuada sustitución volémica y la administración continuada de vasopresores. Es un tipo de shock distributivo en el que las resistencias vasculares y sistémicas se ven reducidas y que generalmente se acompaña de un aumento del gasto cardíaco.

- Fallo multiorgánico:

Cuadro clínico que se caracteriza por la disfunción progresiva de dos o más órganos vitales de manera que no pueden llevar a cabo su actividad de manera espontánea. Puede ser primario (consecuencia directa del agente desencadenante) o secundario a la respuesta inflamatoria del propio organismo. Si no se revierte, esta situación puede conducir a la muerte del paciente.

Se le dio gran importancia al hecho de diferenciar el SIRS de origen infeccioso/no infeccioso y poder estratificar la progresión de la enfermedad en estos tres estadios (sepsis, sepsis grave y shock séptico), ya que la presencia de una u otra situación clínica condicionaba el manejo y la evolución del paciente.

En el año 2001 se celebró la Conferencia Internacional de Sepsis, en la que se estableció un nuevo sistema que contemplaba distintos estadios en el paciente séptico, el sistema *PIRO*, por sus siglas en inglés, y que tenía en cuenta:

- Predisposición → Susceptibilidad genética del paciente y posibles resistencias a antimicrobianos.
- Infección → Patogenia, toxicidad e inmunidad y su localización.
- Respuesta → Incremento de biomarcadores, y presencia de síntomas fisiológicos evidentes.
- Disfunción orgánica → Número de órganos afectados en el paciente.

Su fin era estratificar a los pacientes no sólo en relación con la clínica que presentaban sino también en función de los nuevos marcadores bioquímicos de inflamación que se desarrollaron, tales como la proteína C reactiva (PCR), la procalcitonina (PCT) y la interleucina 6 (IL6). Éstos permitían diferenciar la presencia de signos y síntomas clínicos de inflamación observados tanto en los procesos infecciosos como no infecciosos independientemente del resultado microbiológico.

Finalmente, en el año 2016 tuvo lugar el Tercer Consenso Internacional donde se reunió un grupo de trabajo de 19 expertos convocados por la Sociedad de Medicina de Cuidados Críticos y la Sociedad de Medicina Intensiva con el objetivo de actualizar las definiciones y conceptos (Tabla 1)

Este último consenso, conocido como *Sepsis-3* ha supuesto un cambio de paradigma con respecto a los previos, ya que se le otorga mayor importancia a la disfunción orgánica frente a la respuesta inflamatoria en el diagnóstico de esta patología. Para ello se desarrolló la escala SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) que consiste en la combinación de criterios clínicos y de laboratorio para valorar la función de 6 órganos con una puntuación entre 0-4 (Tabla 2).

Además, se introdujo una nueva herramienta de cribado, *quick SOFA* (qSOFA), para la identificación rápida y estratificación del riesgo de aquellos pacientes con infección y que podrían tener una peor evolución a corto plazo. Se trata de una escala de puntuación que valora tres variables clínicas: alteración mental, frecuencia respiratoria y tensión arterial sistólica.

FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS

Las bacterias Gram+ y Gram- poseen moléculas únicas en su pared celular, denominadas patrones moleculares

asociados a patógenos, que se enlazan a receptores *toll-like receptors* (TLR) en la superficie de las células inmunes. El lipopolisacárido (LPS) de los bacilos Gram- se une a la proteína enlazadora de LPS, el complejo CD14. Por otro lado, el peptidoglicano de las bacterias Gram+ y los LPS de las Gram- se enlazan a TLR-2 y TLR-4, respectivamente.

Este enlace a TLR-2 y TLR-4 desencadena rutas de transducción que activan al factor nuclear citosólico NF-κB, que se activa y migra desde el citoplasma al núcleo, se enlaza a sitios de iniciación de la transcripción, e incrementa la producción de citoquinas como el TNF-alfa, la IL-1B y la IL-10.

El TNF-alfa y la IL-1B son citoquinas pro-inflamatorias que activan la respuesta inmune adaptativa pero también causan daño directo e indirecto al huésped. Estas citoquinas pro-inflamatorias estimulan la liberación de otras anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10), así como la de mediadores

antitrombóticos (PCR y antitrombina), e inducen la apoptosis de los linfocitos. La IL-10 es una citoquina con diversos efectos antiinflamatorios que inactiva a los macrófagos.

La sepsis incrementa la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual aumenta la síntesis de óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador. Las citoquinas activan

<ul style="list-style-type: none"> ▪ La sepsis se define como una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección que surge cuando la respuesta del organismo a una infección lesiona sus propios tejidos y órganos.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ La disfunción de órganos puede identificarse como un cambio agudo en la puntuación total del SOFA ≥ 2 puntos como consecuencia de la infección
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Los pacientes pueden ser rápidamente identificados a pie de cama con el quick SOFA, que tiene en cuenta la alteración del estado mental (valor ≤ 13 en la escala de Glasgow), la presión arterial sistólica ≤ 100 mmHg o frecuencia respiratoria ≥ 22/min.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ El shock séptico es un subconjunto de la sepsis en el que las anomalías circulatorias y celulares/metabólicas subyacentes son lo suficientemente profundas como para aumentar sustancialmente el riesgo de mortalidad.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Los pacientes con shock séptico pueden identificarse con una sepsis con hipotensión persistente que requiere vasopresores para mantener una presión arterial media de 65 mmHg y tener un nivel de lactato sérico > 2 mmol/L (18 mg/dL) a pesar de la reanimación volémica adecuada.

Tabla 1. Nuevos términos y definiciones. Tomado de: Singer M, Deutschman CS, Seymour CW *et al*, 2016.

Sistema	Puntuación				
	0	1	2	3	4
Respiratorio					
PaO ₂ /FiO ₂ mmHg	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7)	<100 (13.3)
Coagulación					
Plaquetas x10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Hepático					
Bilirrubina mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	6.0-11.9
Cardiovascular					
Tensión Arterial Media (TAM) Drogas vasoactivas (ug/kg/min)	TAM ≥70mm Hg	TAM <70mm Hg	Dopamina <5	Dopamina 5.1-15 Epinefrina ≤ 0.1	Dopamina >15 o Epi/norepinefrina >0.1
SNC					
Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<5
Renal					
Creatinina, mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9	>5.0
Diuresis				<500	<200

Tabla 2. Criterios de puntuación escala SOFA. Tomado de: Singer M, Deutschman CS, Seymour CW *et al*, 2016.

las células endoteliales regulando los receptores de adhesión y de moléculas de daño endotelial mediante la

inducción de neutrófilos, monocitos, macrófagos y plaquetas que se enlazan a las células endoteliales. Dichas células efectoras liberan mediadores como proteasas, oxidantes, prostaglandinas y leucotrienos.

Las funciones clave del endotelio son la permeabilidad selectiva, la vaso-regulación, y el aporte de una superficie anticoagulante. Las proteasas, los oxidantes, las prostaglandinas y los leucotrienos dañan las células endoteliales, produciendo una permeabilidad incrementada, la consiguiente vasodilatación y la alteración del equilibrio procoagulante-anticoagulante. Las citoquinas también activan la cascada de la coagulación, como se describe a continuación.

La sepsis desencadena el proceso de coagulación al activar el endotelio e incrementar la expresión del factor tisular (Figura 3). Se activa así la cascada de coagulación, y especialmente de los factores Va y VIIIa que conducen a la formación de trombina-alfa, responsable de la conversión de fibrinógeno en fibrina. La fibrina se enlaza a las plaquetas, que a su vez se adhieren a las células endoteliales, formando micro trombos vasculares. Dichos trombos microvasculares

amplifican el daño a través de la liberación de mediadores y la obstrucción vascular, que causa isquemia e hipoxia tisular.

Normalmente los anticoagulantes naturales (proteína C y S), antitrombina III y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) impiden la coagulación y favorecen la fibrinólisis eliminando los micro trombos. La trombina-alfa se une a la trombomodulina en las células endoteliales, lo que incrementa significativamente la activación de proteína C a proteína C activada. Esta proteína C forma un complejo con su cofactor y la proteína S. La proteína C activada inactiva proteolíticamente los factores Va y VIIIa y reduce la síntesis de inhibidor 1 del activador de plasminógeno (PAI-1).

Por el contrario, la sepsis provoca la síntesis de PAI-1, así como un descenso de los niveles de proteína C, S, antitrombina III y TFPI. Por tanto, los cambios inducidos por la sepsis en el proceso de coagulación originan el incremento de las concentraciones de marcadores de diseminación de la coagulación intravascular y de disfunción orgánica (disminución de la fibrinólisis).

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

La gravedad de la sepsis es tiempo-dependiente, suponiendo un desafío asistencial su rápida identificación y

tratamiento. Como hemos visto, un retraso en su detección podría suponer su evolución a shock séptico, disfunción orgánica múltiple e incluso la muerte. Su rápida identificación es por tanto clave para lograr una reducción de su mortalidad ya que por cada hora de retraso en el inicio del tratamiento su mortalidad se incrementa un 8%.

Un proceso asistencial completo con un seguimiento de las guías clínicas en cuanto a constantes, cultivos y pruebas de laboratorio junto con el inicio del tratamiento antibiótico dentro de las primeras 3 horas desde la llegada del paciente a urgencias, reduce la tasa de mortalidad hasta en un 40%, siendo del 36% a las 6 horas. Este es el objetivo principal del Código Sepsis, herramienta implementada en instituciones sanitarias cuya finalidad es estandarizar el proceso asistencial para la rápida identificación de cuadros clínicos infecciosos con riesgo de sepsis e iniciar precozmente tratamientos adecuados para disminuir sus complicaciones y mortalidad.

Es por ello por lo que se hace necesaria la búsqueda de biomarcadores que reflejen el proceso fisiopatológico de la sepsis de la forma más precoz e inequívoca posible, con el objetivo de conseguir una identificación rápida y con ello un mejor manejo clínico del paciente.

Debido a la complejidad de esta patología, entre las cualidades para la búsqueda de un buen test diagnóstico se buscan las siguientes características:

- Rápido, con un tiempo de respuesta sea inferior a 1 hora.
- Posibilidad de que esté disponible en una plataforma de *Point Of Care Testing* (POCT).
- Fiable y robusto.
- Con una alta sensibilidad y especificidad.

- Toma especial importancia que tenga alto Valor Predictivo Negativo (VPN > 98%).
- Bajo coeficiente de variación y estable en el tiempo.
- Disponible 24 horas.
- Económico, si es posible.

El abordaje desde el laboratorio pasa por el diagnóstico Microbiológico, Hematológico y Bioquímico.

• Diagnóstico Microbiológico

El Diagnóstico Microbiológico de la sepsis se ha considerado durante años el *Gold standard* ya que permite identificar el agente etiológico de la infección, así como definir su sensibilidad mediante la realización del antibiograma.

Es fundamental extraer hemocultivos en todos los pacientes con sepsis grave, aunque no exista pico de fiebre en ese momento. Se deben extraer al menos dos sets de hemocultivos, cada uno de un lugar de venopunción diferente. Lo más adecuado es extraer los hemocultivos antes de iniciar la terapia antibiótica.

Si existe un acceso vascular venoso central de más de 48 horas, se debe extraer una muestra de éste y otra de sangre de venopunción. Los cultivos de secreciones respiratorias se recomiendan para el diagnóstico de neumonía asociada a la ventilación mecánica. Los cultivos de otras localizaciones, como orina, líquido cefalorraquídeo, heridas, secreciones respiratorias u otros fluidos corporales deben ser extraídos igualmente antes del inicio del tratamiento antibiótico. Se recomienda recoger las muestras de exudados purulentos en jeringa y aguja aspirando preferentemente de zonas profundas; es recomendable evitar el uso de torundas ya que disminuyen la rentabilidad del cultivo.

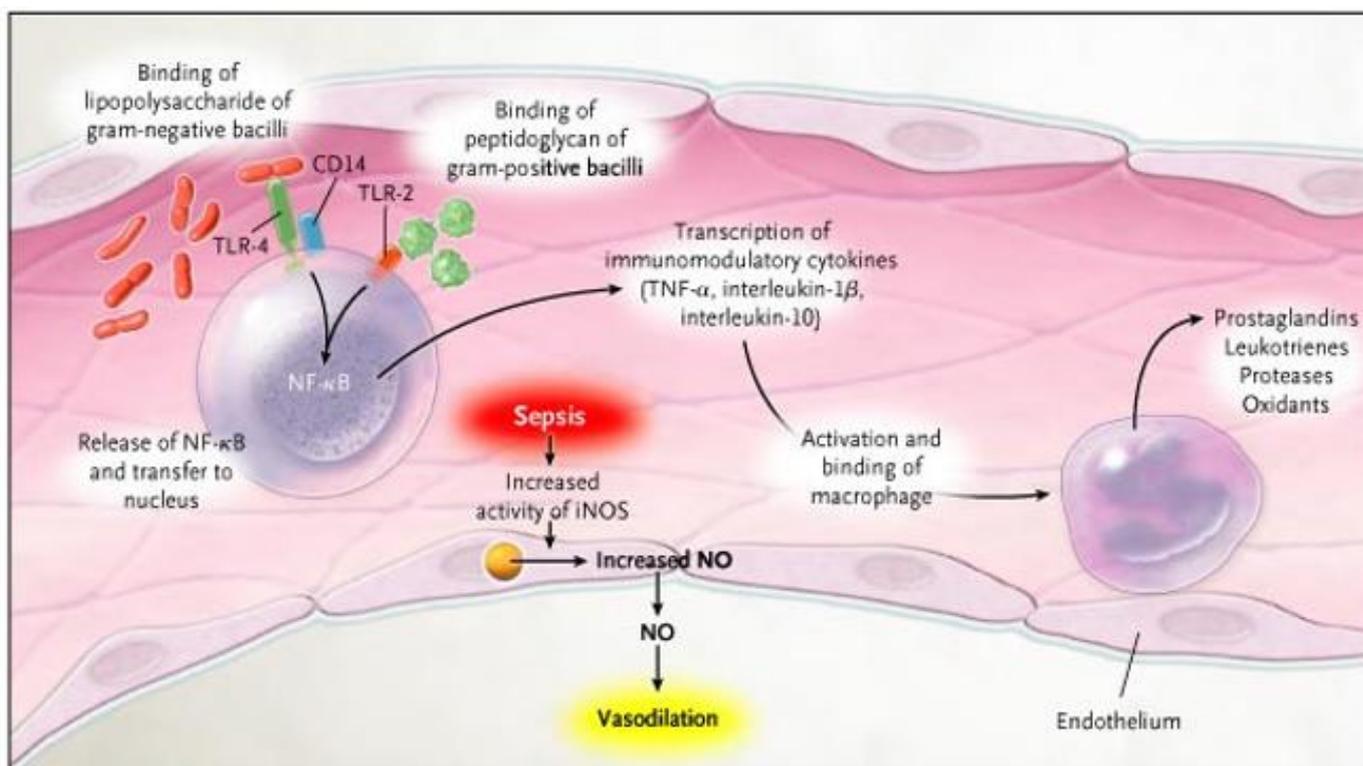


Figura 2. Respuesta inflamatoria a la sepsis. Tomado de: Russell JA, 2006.

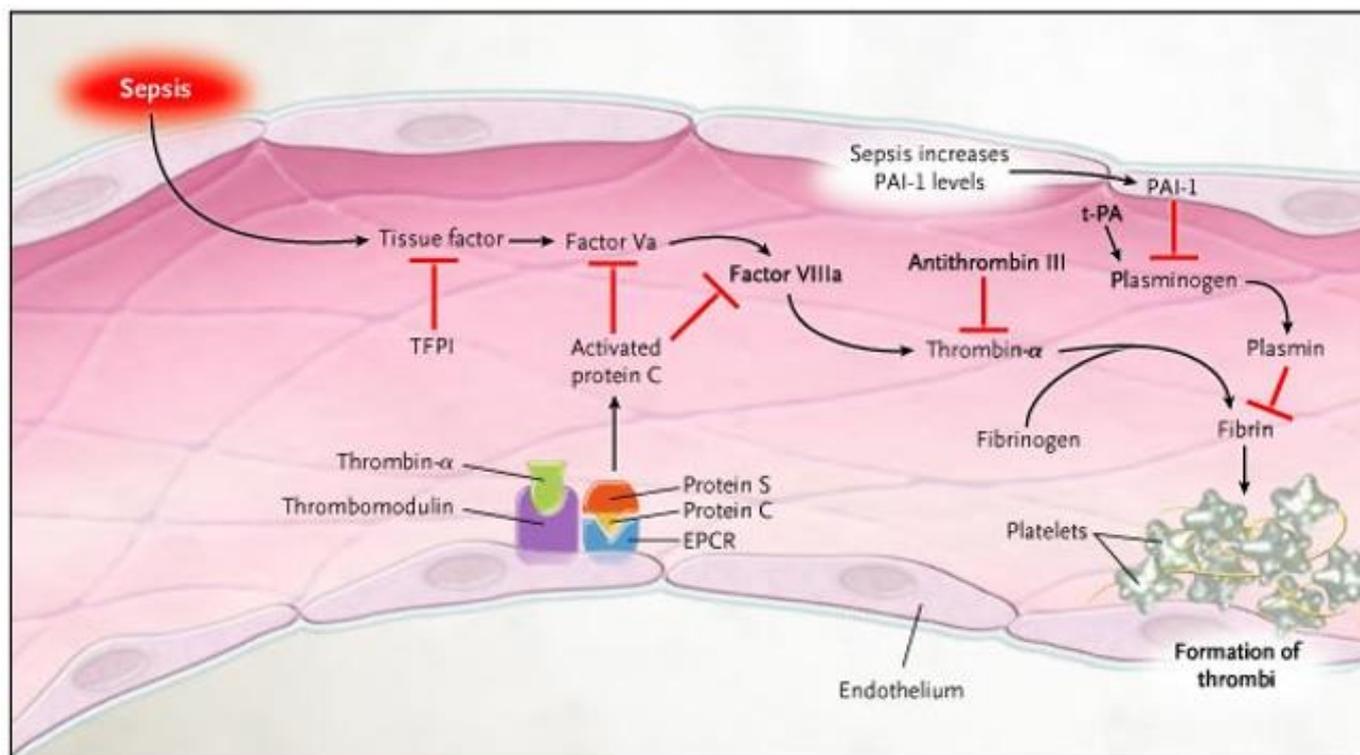


Figura 3. Respuesta procoagulante de la sepsis. Tomado de: Russell JA, 2006.

Si se encuentra disponible, se recomienda realizar tinción de Gram urgente de las muestras que potencialmente puedan ser el origen de la infección (esputo, líquido cefalorraquídeo, muestra de orina, herida o absceso, etc.), ya que puede aportar información sobre el tipo de bacteria originaria de la infección.

Obtener unos cultivos apropiados es fundamental para confirmar la infección y sus patógenos responsables, y permitir reducir el espectro antibiótico una vez recibido el antibiograma. Aun así, la relevancia de esta patología hace estrictamente necesario cubrir con terapia empírica inicial.

• Diagnóstico Hematológico

Se ha observado que, como respuesta al estado séptico, se alteran el tamaño y la función de los leucocitos.

Los *Cell Population Data* (CPD) son unos parámetros numéricos proporcionados por los analizadores hematológicos que definen diferentes poblaciones celulares. Los CPD permiten conocer cambios en la granulación, en el citoplasma o en el tamaño de las distintas células, indicando la respuesta a diferentes procesos fisiopatológicos como es el caso de la sepsis.

Para ello utilizan distintos parámetros:

- Volumen (V)
- Conductividad (C) para determinar la composición interna de la célula.
- Dispersión de la luz láser en 5 ángulos distintos (MALS, UMALS, LMALS, LALS y AL2) para el análisis de la granularidad citoplasmática y estructura nuclear.

Estas mediciones proporcionan una media (M) y desviación estándar (DE) de cada parámetro en cada población celular analizada, aplicables en el diagnóstico de sepsis. Los modelos estadísticos se pueden utilizar para fortalecer el diagnóstico.

Uno de los CPD mejor estudiado y que se ha postulado como un marcador en la detección temprana de sepsis es el ancho de distribución de monocitos (*Monocyte Distribution Width* o "MDW" por sus siglas en inglés) que consiste en una medida cuantitativa de la dispersión del tamaño celular en la población de monocitos.

En el curso de la sepsis, los monocitos en sangre periférica sufren una polarización entre su estado hiperinflamatorio y el de inmunosupresión, alterando su funcionalidad y estructura celular.

La heterogeneidad de las subpoblaciones de monocitos en sangre periférica permanece estable en condiciones fisiológicas normales, pero se ve incrementada en respuesta a diversos procesos infecciosos como la sepsis. Durante este proceso la subpoblación no-clásica puede variar del 10% a representar más del 50% de los monocitos presentes en sangre periférica, incrementado su polarización entre los estados hiperinflamatorios e inmunosupresores. Estos procesos conllevan cambios funcionales y conformacionales de los monocitos, produciendo su estimulación celular, secreción de citoquinas pro y antiinflamatorias e incremento del tamaño celular, siendo la base para la determinación celular del MDW.

Un incremento en el MDW refleja la heterogeneidad de la población monocítica en respuesta a una infección o sepsis.

• **Diagnóstico Bioquímico**

- **Lactato**

Es un marcador de hipoxia tisular derivado del metabolismo anaerobio celular por lo que es frecuente su elevación en caso de sepsis grave o shock séptico.

Es fundamental su determinación en fases iniciales (en las dos primeras horas) de la sepsis para estratificar el riesgo ya que se ha descrito como predictor independiente de mortalidad: niveles intermedios por encima de 2 mmol/l y especialmente elevados por encima de 4 mmol/l.

Puede ser el único indicador de hipoperfusión en pacientes normotensos. Su determinación precoz se considera un marcador de calidad en la atención inicial del paciente séptico: ante un nivel elevado (mayor de 4 mmol/l) la fluidoterapia inicial debe ser agresiva.

Su disminución en las primeras 24 horas se relaciona con un mejor pronóstico de pacientes sépticos ingresados en UCI.

Para recoger adecuadamente la muestra, debe evitarse la estasis venosa (no comprimir el extremo proximal del brazo), y para un correcto análisis deben transcurrir como máximo 30 minutos entre la extracción y su determinación.

- **Proteína C Reactiva (PCR)**

Es la proteína de fase aguda clásica de las reacciones inflamatorias. Se sintetiza en el hígado y se compone de cinco cadenas polipeptídicas idénticas en forma de anillo. La PCR es el reactante de fase aguda más sensible y su concentración aumenta muy rápidamente en procesos inflamatorios precediendo a los síntomas clínicos, incluyendo la fiebre.

El complejo formado por la PCR activa la vía clásica del complemento.

Como biomarcador, presenta elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de inflamación. Aunque no es específico de infección, niveles especialmente elevados (> 8-10 mg/dL) se relacionan con etiología infecciosa. Su especificidad, sin embargo, disminuye significativamente a la

hora de diferenciar la etiología bacteriana, viral o fúngica de la infección.

- **Procalcitonina (PCT)**

La PCT es un precursor polipeptídico de la calcitonina, hormona implicada en la homeostasis del calcio. En condiciones fisiológicas la calcitonina y sus precursores son sintetizados por las células C neuroendocrinas medulares del tiroides en respuesta a la activación del gen CALC-I. La hormona se sintetiza a partir de sus precursores, y se almacena en dichas células hasta su secreción mediada por un estímulo hormonal o metabólico.

El principal estímulo para la liberación de PCT durante una infección es la endotoxina bacteriana. En sujetos sanos se produce un gran incremento en las concentraciones séricas de PCT a las 3-4 horas del estímulo de esta endotoxina, alcanzando concentraciones máximas a las 6-8 horas y permaneciendo elevada al menos durante 24-30h. Por otra parte, situaciones críticas no asociadas a infección, como las quemaduras graves, los traumatismos o la cirugía mayor presentan incrementos de las concentraciones séricas de PCT. En neonatos también se ha descrito una elevación fisiológica de PCT, en las primeras 48-72h de vida, probablemente debido al estrés sufrido durante el nacimiento. Todo esto sugiere la existencia de otra vía de activación de PCT, relacionada con la respuesta inmunitaria. Las citoquinas, podrían ser los inductores de la liberación de PCT tras un estímulo inflamatorio, infeccioso o no (Figura 4).

Se ha descrito que los pacientes tiroidectomizados con sepsis son capaces de producir elevadas cantidades de la prohormona, por lo que la PCT producida durante los procesos infecciosos ha de tener un origen extra tiroideo. Estructuralmente esta PCT es idéntica a la producida por las células C del tiroides y no se conoce ningún otro gen que codifique para la síntesis de la PCT durante los procesos inflamatorios e infecciosos, de modo que el propio CALC-I podría activar la producción de PCT extra tiroidea, al expresarse en diversos tejidos del organismo. Sin embargo, no se observa incremento en las concentraciones de la

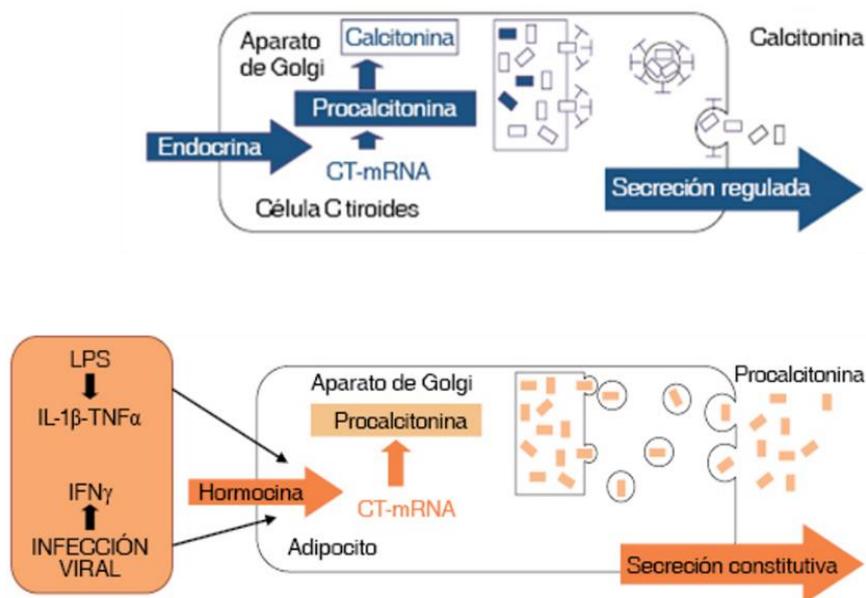


Figura 4. Síntesis fisiológica vs síntesis patológica de la PCT. Tomado de: Linscheid P *et al*, 2003.

hormona calcitonina en presencia de sepsis, lo que sugiere la existencia de una ruta alternativa diferente a la específica que conduce a la síntesis de calcitonina. Tras una infección sistémica se produce una activación generalizada del gen de la calcitonina, expresado en todas las células parenquimales del organismo, incluyendo el hígado, riñón, pulmón, células musculares y adipocitos.

En ausencia de infección, la transcripción extra tiroidea del gen estaría suprimida, de modo que la expresión estaría mediada por calcio y estímulos hormonales tan solo en las células neuroendocrinas, principalmente tiroideas, pero también pulmonares. Por el contrario, tras una infección microbiana se induciría la expresión generalizada del gen en todo el organismo, mediada por la endotoxina y las citosinas pro inflamatorias. El organismo entero actuaría como una glándula endocrina de forma análoga a la liberación de citoquinas por parte del sistema inmunitario.

Debido a este complejo mecanismo de liberación, este tipo de moléculas son denominadas "hormokinas" por algunos autores, dado que actúan con funciones de hormona o de citoquina, en función del estímulo que las produce.

Al iniciarse la respuesta de fase aguda, la concentración sérica de la PCR aumenta rápida y acentuadamente. Este aumento comienza entre 6 y 12 horas tras el inicio de la fase aguda y alcanza su valor máximo pasadas 24 horas. Este pico a las 48 horas impide su uso como marcador diagnóstico precoz.

La vida media corta de las citosinas en circulación sanguínea, con valores normales a las 24 horas, contrasta con la de la PCT, que permanece elevada mientras perdura el estímulo inflamatorio (Figura 5).

Comienza a elevarse a las 2-4 horas del inicio del cuadro séptico, con un pico de máxima liberación a las 24 horas, manteniéndose elevada hasta la resolución del proceso. Su aumento (>5 ng/ml) orienta hacia un origen bacteriano.

Por todo ello la PCT se considera un buen marcador del estado séptico del paciente que puede ayudar al clínico a monitorizar tanto el estado inicial del paciente como su respuesta al tratamiento antibiótico.

CONCLUSIONES

- 1) La sepsis es una patología compleja que necesita un diagnóstico rápido y fiable y un abordaje estandarizado que ayude a salvar vidas.
- 2) Las sociedades y consensos internacionales son cruciales para el establecimiento de guías y códigos que permitan una rápida identificación y estratificación del paciente séptico.
- 3) Aunque el tratamiento empírico es indiscutible, sigue siendo muy importante discernir el origen y establecer el microorganismo causal para establecer un tratamiento dirigido que disminuya la aparición de resistencias bacterianas.
- 4) Existen nuevos parámetros como los *Cell Population Data* y nuevas utilidades de otros como la PCT cuyo manejo pueden ayudar al clínico a discernir en poco tiempo el estado séptico del paciente.
- 5) No existe el marcador perfecto de sepsis. Una valoración conjunta e integral de los parámetros disponibles mejora el diagnóstico, manejo y pronóstico de los pacientes, por lo que el laboratorio es parte esencial en el diagnóstico y monitorización de esta patología.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

- Agnello L, Iacona A, Lo Sasso B, Scazzone C, Pantuso M, Giglio RV, et al. A new tool for sepsis screening in the Emergency Department. *Clin Chem Lab Med*. 2021;59(9):1600-5.
- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*. 1992;20(6):864-74.
- Crouser ED, Parrillo JE, Martin GS, Huang DT, Hausfater P, Grigorov I, et al. Monocyte distribution width enhances early sepsis detection in the emergency department beyond SIRS and qSOFA. *J Intensive Care*. 2020;8:33.
- Crouser ED, Parrillo JE, Seymour C, Angus DC, Bicking K, Tejedor L, et al. Improved Early Detection of Sepsis in the ED With a Novel Monocyte Distribution Width Biomarker. *Chest*. 2017;152(3):518-26.
- Crouser ED, Parrillo JE, Seymour CW, Angus DC, Bicking K, Esguerra VG, et al. Monocyte Distribution Width: A Novel Indicator of Sepsis-2 and Sepsis-3 in High-Risk Emergency Department Patients. *Crit Care Med*. 2019;47(8):1018-25.
- Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med*. 2021;49(11):e1063-e143.

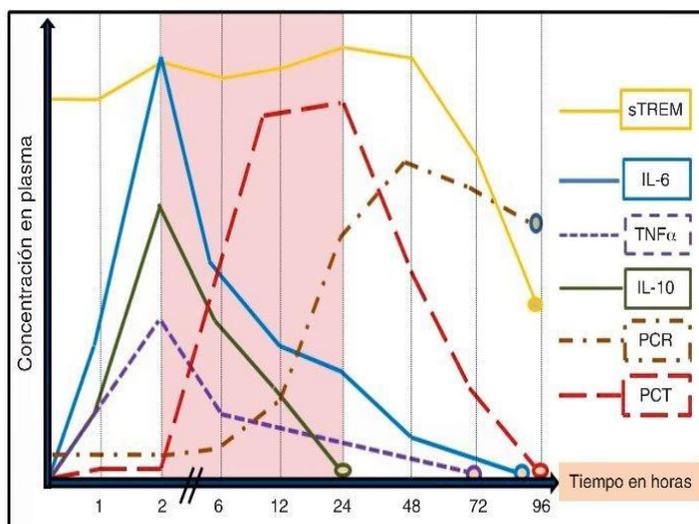


Figura 5. Cinética de liberación plasmática de citoquinas tras estimulación con endotoxina bacteriana. Tomado de: Nylén ES, 2001.

- Hausfater P, Robert Boter N, Morales Indiano C, Cancellata de Abreu M, Marin AM, Pernet J, et al. Monocyte distribution width (MDW) performance as an early sepsis indicator in the emergency department: comparison with CRP and procalcitonin in a multicenter international European prospective study. *Crit Care*. 2021;25(1):227.
- Iñigo J, Sendra JM, Díaz R, Bouza C, Sarría-Santamera A. Epidemiología y costes de la sepsis grave en Madrid. *Estudio de altas hospitalarias. Med Intensiva*. 2006;30(5):197-203.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*. 2003; 29(4):530-8.
- Linscheid P, Seboek D, Nylén ES, Langer I, Schlatter M, Becker KL, et al. In vitro and in vivo calcitonin I gene expression in parenchymal cells: a novel product of human adipose tissue. *Endocrinology*. 2003 Dec;144(12):5578-84. Disponible en: <https://doi.org/10.1210/en.2003-0854>
- Martínez-Iribarren A, Tejedor X, Sala Sanjaume À, Leis A, Doladé Botias M, Morales-Indiano C. Performance evaluation of the new hematology analyzer UniCel DxH 900. *Int J Lab Hematol*. 2021;43(4):623-31.
- Nylén ES, Alarifi AA. Humoral markers of severity and prognosis of critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2001 Dec;15(4):553-73.
- Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med*. 2006 Oct 19;355(16):1699-713. Disponible en: <https://doi.org/10.1056/NEJMra043632>. Erratum in: *N Engl J Med*. 2006 Nov 23;355(21):2267.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-10.
- Tak T, van Groenendaal R, Pickkers P, Koenderman L. Monocyte Subsets Are Differentially Lost from the Circulation during Acute Inflammation Induced by Human Experimental Endotoxemia. *J Innate Immun*. 2017;9(5):464-74.
- Woo A, Oh DK, Park CJ, Hong SB. Monocyte distribution width compared with C-reactive protein and procalcitonin for early sepsis detection in the emergency department. *PLoS One*. 2021;16(4):e0250101.
- Yamaguchi H, Haranaga S, Widen R, Friedman H, Yamamoto Y. Chlamydia pneumoniae infection induces differentiation of monocytes into macrophages. *Infect Immun*. 2002;70(5):2392-8.
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80.

LITIASIS URINARIA

Autores: Eva Barbón Alonso¹; Daniel Párraga García²

¹Servicio de Análisis Clínicos, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona

²Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Litiasis, Cálculo urinario

INTRODUCCIÓN

La litiasis urinaria o urolitiasis se define como la presencia de cálculos de composición y tamaño variable a lo largo de las vías urinarias. Se clasifica en función de su ubicación en dos tipos: litiasis en el tracto urinario inferior y en el tracto urinario superior, también denominada renoureteral.

Los cálculos urinarios se forman secundariamente a una gran variedad de alteraciones metabólicas que modifican la composición de la orina. Además, existe una serie de factores que aumentan el riesgo de litiasis, entre los que destacan:

- **Raza:** Predomina en personas de raza blanca y asiática.
- **Nivel socioeconómico:** Asociada generalmente a países ricos e industrializados debido a su estilo de vida.
- **Dieta:** La litiasis se ve favorecida por la ingesta elevada de proteínas de origen animal, grasas insaturadas y sal. La baja ingesta de agua favorece la concentración de la orina, aumentando el riesgo de formación de cristales.
- **Clima:** En zonas de clima cálido se produce una mayor deshidratación que, al igual que en casos de baja ingesta hídrica, da lugar a una orina concentrada con mayor posibilidad de cristalización de los compuestos formadores del cálculo.
- **Nivel de actividad física:** Un estilo de vida sedentario favorece la formación de cálculos renales. El ejercicio físico frecuente se considera un factor protector de la litiasis.

Su incidencia es mayor en el sexo masculino entre la cuarta y la sexta década de vida. Presenta una elevada tasa de recidivas, en diversos estudios se ha determinado que un año después del primer episodio litiásico se producirá un segundo episodio en un 15% de los pacientes, este porcentaje aumenta hasta llegar a un 35% tras 5 años y un 60% a los diez años. Por ello, la litiasis se define como una patología crónica y es de suma importancia identificar las causas que la producen y ofrecer medidas para prevenir su reaparición.

Supone un importante impacto a nivel económico, sanitario y social ya que se trata de una de las patologías urológicas con mayor cantidad de consultas médicas generadas, así como ingresos hospitalarios. Además, se ha producido un notable incremento de la prevalencia de litiasis en los últimos años.

PROCESO DE FORMACION DEL CÁLCULO

El primer paso en la formación del cálculo consiste en un aumento de la concentración del compuesto formador en orina hasta llegar a un estado de sobresaturación. A partir de este punto, no podrá disolverse en la orina en su totalidad y comenzará a precipitar en forma de cristales.

Posteriormente se produce la germinación cristalina, que se caracteriza por un aumento en el tamaño de los cristales debido a la continua precipitación del compuesto formador. Además, estos cristales se agregan entre sí, produciendo un aumento de su tamaño.

La última etapa se denomina nucleación. Las partículas en condiciones de sobresaturación continúan depositándose en la superficie del cálculo primario formando estratos. En el momento en que el cálculo alcance un tamaño suficiente, permanecerá retenido en los conductos urinarios.

Durante el proceso de nucleación es frecuente que se produzca el depósito de cristales de diferente composición, lo que se denomina nucleación heterogénea. Otro tipo de nucleación, menos común, es la homogénea, en la que todos los cristales son del mismo tipo, esto ocurre principalmente en casos de cistinuria.

Los diferentes componentes del cálculo se definen como promotores de la cristalización, los principales son calcio, oxalato, ácido úrico, fosfatos y cistina. Otras sustancias actúan como inhibidoras de la cristalización debido a su capacidad quelante de las sustancias formadoras. Los inhibidores más importantes son el magnesio (quelante de oxalato) y el citrato (quelante de calcio).

En individuos sanos, existe un equilibrio entre promotores e inhibidores de la cristalización que impide el depósito de sustancias formadoras del cálculo. Cuando este equilibrio se altera, debido a un aumento en la concentración de promotores o a una reducción en la de inhibidores, se favorece el depósito de las partículas y, por consiguiente, la cristalización y formación del cálculo.

CLASIFICACIÓN

Los cálculos urinarios se componen de una matriz orgánica y una fase cristalina.

La matriz orgánica está formada por mucoproteínas, azúcares y hexosaminas.

La fase cristalina define la clasificación del cálculo. Se forma a partir de los compuestos formadores del cálculo que cristalizan en la orina del paciente, entre los cuales los más frecuentes son:

- **Oxalato de calcio**

Es el componente más frecuente de los cálculos urinarios. Se encuentra en forma de oxalato cálcico monohidratado (whewellita) o dihidratado (wheddellita). Las causas principales de su formación son la hipercalciuria y la hiperoxaluria

- **Fosfato**

En forma de fosfato amónico-magnésico (estruvita), fosfato cálcico (apatita) o fosfato hidratado de calcio (brushita). La cristalización de los fosfatos se ve favorecida a pH básico.

Generalmente este tipo de litiasis es secundaria a hiperparatiroidismo, acidosis tubular distal o infecciones por gérmenes urealíticos. En caso de infección se forman principalmente cálculos de estruvita, denominados comúnmente cálculos infecciosos.

- **Ácido úrico**

Puede cristalizar en forma anhidra o hidratada. Su precipitación se ve favorecida con un pH urinario inferior a 5,5.

Se observan en caso de orinas con pH repetitivamente ácido y patologías que cursan con hiperuricemia.

- **Cistina**

Es el componente menos frecuente de los cálculos renales. Aparece en casos de cistinuria, una tubulopatía hereditaria que genera alteraciones en la absorción de aminoácidos dibásicos.

CAUSAS

La litiasis se debe en la mayor parte de los casos a alteraciones metabólicas que desencadenan hipercalcemia, hipercalciuria, hiperoxaluria, hiperuricosuria, hipocitraturia e hipomagnesuria.

Existe relación entre la composición del cálculo y la anomalía metabólica subyacente. Por ello, es muy importante conocer la composición para poder realizar un diagnóstico correcto de la patología causante de su formación.

- **Hipercalciuria:**

Se caracteriza por un aumento en la excreción renal de calcio que genera depósitos a nivel tubular y favorece la formación de cálculos de oxalato y fosfato cálcico. Las principales causas de hipercalciuria son:

- **Hiperparatiroidismo primario:** Es la causa más frecuente de litiasis por hipercalciuria. El 50-70% de los pacientes con esta patología presenta litiasis renal recidivante con composición mixta de oxalato cálcico y fosfato.
- **Sarcoidosis.**
- **Intoxicación por vitamina D.**
- **Hipercalciuria idiopática:** Se define como un aumento mantenido en la eliminación urinaria del calcio, sin causa aparente y en ausencia de hipercalcemia.

- **Hiperoxaluria:**

Consiste en una eliminación excesiva de oxalato en orina. Puede clasificarse en:

- **Hiperoxaluria primaria:** Aumento de la producción endógena de oxalato. Debida a alteraciones enzimáticas a nivel hepático.
- **Hiperoxaluria secundaria:** Aumento de la absorción intestinal de oxalato.

En caso de hipercalciuria e hiperoxaluria se producirá la acumulación de oxalato cálcico a nivel tubular generando cálculos.

La principal diferencia entre estas dos alteraciones metabólicas es que, en caso de hipercalciuria, el cálculo se encuentra compuesto principalmente por oxalato cálcico dihidratado mientras que, en caso de hiperoxaluria, el compuesto principal será oxalato cálcico monohidratado.

- **Hiperuricosuria:**

Es un factor de riesgo para la formación de cálculos de ácido úrico y de oxalato cálcico (en este caso debido a un proceso de nucleación heterogénea).

Podemos diferenciar entre alteraciones con sobreproducción de ácido úrico (asociadas a hiperuricemia) y alteraciones con disminución de su reabsorción tubular (asociadas a hipouricemia).

El ácido úrico requiere de un pH ácido para precipitar en orina. Las causas de la formación de cálculos de ácido úrico son:

- **pH urinario repetidamente ácido:** En caso de pH inferior a 5,5 el ácido úrico se encuentra en forma insoluble, por lo que aumenta la probabilidad de cristalización.
- **Origen dietético:** Es la causa más frecuente de hiperuricosuria en países desarrollados. Se produce debido a un consumo excesivo de proteínas animales por su contenido en derivados purínicos.
- **Hiperuricemia primaria:** Se debe a alteraciones enzimáticas en la síntesis de purinas: aumento de la actividad de fosforribosilpirofosfato sintetasa (PRPPs) o déficit de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT).
- **Medicamentos uricosúricos:** Como probenecid y sulfipirazona cuyo mecanismo de acción consiste en aumentar la excreción renal de ácido úrico.¹
- **Alteraciones proliferativas:** Patologías como linfomas o leucemias agudas conllevan una importante destrucción celular, denominada síndrome de lisis tumoral, que produce liberación de purinas y aumento de la uricemia.²
- **Enfermedad inflamatoria intestinal.**
- **Hipomagnesuria:**

El magnesio bloquea la formación de cálculos de oxalato por dos motivos: es quelante de oxalato y, además, reduce su absorción intestinal. Bajos niveles de magnesio favorecen la

aparición de cálculos de oxalato. La hipomagnesuria puede tener dos causas: Origen dietético y Malabsorción intestinal.

- **Hipocitraturia:**

En pacientes con litiasis suele coexistir con otras alteraciones metabólicas. El citrato bloquea la cristalización de oxalato y fosfato cálcicos, por lo que su déficit aumenta la formación de cálculos de este tipo. Las principales causas de la reducción de su concentración en orina son:

- **Insuficiencia renal crónica.**
- **Acidosis tubular renal:** la excreción renal de citrato se encuentra íntimamente relacionada con el equilibrio ácido-base. Estados de acidosis incrementan su reabsorción tubular, reduciendo la concentración de citrato en orina.

- **Cistinuria:**

Patología de baja prevalencia con herencia autosómica recesiva. Generalmente se diagnostica antes de la adolescencia.

Se trata de una tubulopatía caracterizada por un defecto en la reabsorción tubular proximal de aminoácidos dibásicos (arginina, lisina, cistina y ornitina).

Se observa una hipersecreción de estos cuatro aminoácidos en orina, siendo la cistina la única con consecuencias clínicas. Conduce a la formación de cálculos de repetición debido a su baja solubilidad en pH ácido.

En el sedimento urinario detectaremos cristales de cistina, típicamente hexagonales.

A pesar de ser una causa poco frecuente de litiasis, realizaremos el *screening* de cistinuria en los casos de cálculos en la infancia o litiasis recidivante.

- **Infecciones repetidas por organismos urealíticos:**

Se trata de bacterias productoras de ureasa que liberan amonio a partir de urea incrementando el pH de la orina. Se favorece la cristalización de diversas sustancias, principalmente estruvita (fosfato de amonio y magnesio) y, en menor proporción, carbonato de apatita (fosfato cálcico) y urato monoamónico. Estas bacterias son *Proteus*, *Ureaplasma urealyticum* y ciertas cepas de *Klebsiella* o *Serratia*.

Es una de las causas principales de formación de cálculos coraliformes asociados a la infección a nivel renal.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La litiasis urinaria se manifiesta frecuentemente en forma de cólico nefrítico. Sin embargo, puede ser asintomática o presentar sintomatología variada (hematuria, dolor lumbar o síndrome miccional).

El cólico nefrítico constituye el motivo más frecuente de asistencia urgente grave en el ámbito urológico. En la litiasis se produce obstrucción en el tracto urinario que genera presión y dolor agudo e intenso, acompañado ocasionalmente de anuria o fiebre.

En estadios más avanzados pueden surgir complicaciones, especialmente en pacientes con cálculos de repetición. Se trata de manifestaciones de menor frecuencia, pero mayor gravedad como pionefrosis, perinefritis o pielonefritis xantogranulomatosa.

- **Pionefrosis:** retención de orina purulenta a nivel renal que produce descamación del parénquima. Asociada a la formación de cálculos coraliformes.
- **Perinefritis:** se produce cuando la infección se extiende hacia tejidos próximos.
- **Pielonefritis xantogranulomatosa:** es la destrucción del parénquima renal y su sustitución por nódulos de tejido fibroadiposo.

DIAGNÓSTICO

En primer lugar, se realiza una exploración física del paciente en la que se determina su situación clínica.

La sintomatología del paciente, así como su historia clínica personal y familiar, pueden ser de gran ayuda en el diagnóstico. Antecedentes personales de alteraciones endocrinas, acidosis tubular o infecciones de repetición aumentan la sospecha de litiasis.

Es importante tener en cuenta que determinados factores genéticos aumentan la susceptibilidad del individuo a la formación de cálculos. La litiasis monogénica es poco frecuente, pero se relaciona con formas graves de litiasis con un elevado índice de recidivas y un aumento del riesgo de progresión a insuficiencia renal.

Debemos conocer los tratamientos del paciente ya que algunos pueden favorecer el depósito de cristales a nivel urinario: suplementos de calcio, antiácidos quelantes de fósforo, diuréticos, bloqueantes de canales de calcio y agentes uricosúricos, entre otros.

En segundo lugar, es importante realizar un urianálisis y pruebas de imagen.

- **Urianálisis:**

Los parámetros de mayor importancia son el pH de la orina y la presencia o ausencia de hematuria, cristaluria, leucocituria y bacteriuria. El hallazgo más frecuente es la presencia de microhematuria, aunque si el paciente se encuentra en un estadio inicial el urianálisis puede ser normal.

El estudio de la cristaluria es esencial³, sin embargo, debemos tener en cuenta que la presencia de cristales apoya el diagnóstico, pero no lo confirma.

En el sedimento urinario podemos encontrar varios tipos de cristales (Figura 1), entre los que destacan:

- **Ácido úrico:**

Se presenta en forma anhidra, monohidratada, dihidratada o como uratos amorfos. Las formas cristalinas se depositan en orina en forma romboide y las amorfas como granulaciones. Ambas aparecen en casos de pH ácido.

- **Fosfato:**

Puede encontrarse en forma de fosfatos cálcicos o amónico-magnésico. Los cristales de fosfato cálcico suelen precipitar agrupados formando rosetas. Los cristales de fosfato amónico-magnésico se denominan comúnmente "cristales con forma en tapa de ataúd".

- **Oxalato cálcico:**

Se puede encontrar en forma monohidratada o dihidratada en función del cociente Ca/Ox (concentración de calcio dividido entre la concentración de oxalato en orina). Cuando Ca/Ox es superior a 14 predomina la forma dihidratada. En caso de cocientes inferiores a 5 predomina la forma monohidratada. Valores entre 5 y 14 indican una mezcla de ambos tipos.

Generalmente presentan forma octaédrica, aunque adoptan una forma dodecaédrica al aumentar la concentración de calcio en orina, es decir, al aumentar la proporción de la forma dihidratada.

- **Cistina:**

Es el único caso en que la presencia de cristales es patognomónica de una patología concreta (cistinuria). Los cristales se presentan en orina en forma hexagonal.

La desaparición de cristaluria en un paciente litiasico es indicativo de un buen control de la litiasis. Su persistencia es predictora de recidiva.

• **Pruebas de imagen:**

En radiografía simple de abdomen podemos observar imágenes radio-opacas y determinar la situación, tamaño, morfología y número de los cálculos.

La radio-opacidad es dependiente del volumen y la composición del cálculo.

Un aspecto intensamente radiopaco indica una composición mayoritariamente cálcica mientras que los cálculos radiolúcidos se encuentran formados por cistina o ácido úrico.

En caso de observar una imagen mixta, alternando estratos opacos y claros, se sospecha de litiasis mixta úrico-cálcica

Cuando la imagen radiográfica es dudosa o el tamaño es demasiado pequeño se utilizarán otras técnicas de imagen como la ecografía, la urografía intravenosa (UIV) y la tomografía computarizada (TC).

- **Ecografía:** Es de especial utilidad en caso de hidronefrosis secundaria al cálculo.
- **UIV:** Confirma la litiasis y permite evaluar la funcionalidad renal.
- **TC:** Permite realizar un diagnóstico diferencial con otras situaciones en las que exista obstrucción no litiasica del tracto urinario.

En caso de dudas en el diagnóstico se pueden realizar técnicas endoscópicas confirmatorias como uretrocistoscopia y nefroscopia que permiten la visión directa de la vía urinaria.

Una vez confirmada la presencia de un cálculo urinario debemos determinar su composición en el laboratorio. Con todos los datos obtenidos se procederá al diagnóstico de la anomalía metabólica causante.

En función de los resultados debemos diferenciar entre pacientes con un primer episodio de litiasis renal y sin factores de riesgo o pacientes con litiasis de repetición y/o presencia de factores de riesgo.

En caso de tratarse de un primer episodio está indicado el análisis de la composición del cálculo, sedimento urinario, urocultivo, estudios de imagen y bioquímica en suero y orina. En los últimos años se ha descrito como parámetro a destacar el cociente calcio/citrato en orina, un resultado superior a 0,33 conlleva un elevado riesgo de cristalización.

En los pacientes con litiasis múltiples o presencia de factores de riesgo para la recurrencia se solicitará, además de los análisis anteriormente mencionados, una evaluación metabólica que incluya parathormona (PTH) y orina de 24 horas con determinación de calcio, ácido úrico, oxalato, cistina, citrato y magnesio. Confirmamos que la recogida de orina es correcta calculando la eliminación urinaria de creatinina. El rango normal de este cálculo es de 15-25 mg/kg/día.

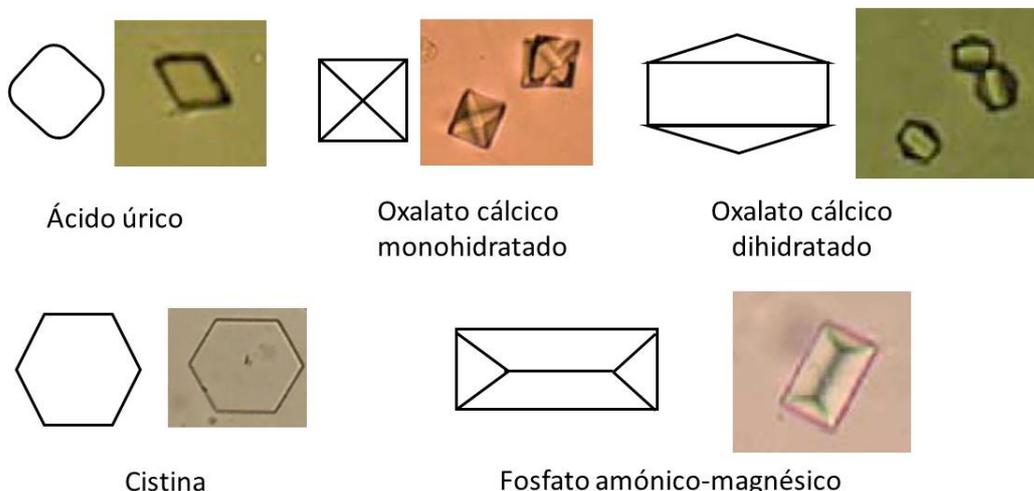


Figura 1. Representación de las formas de los principales cristales observados al microscopio. Adaptado de: Jimenez García JA *et al*, 2010.

Estos análisis se realizarán después de un mes desde el último evento litiásico.

En casos de hipercalciuria está indicada la realización de densitometría ósea de columna y cadera por el importante compromiso óseo asociado a esta condición.

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL CÁLCULO

A nivel del laboratorio la técnica utilizada de manera más frecuente para determinar la composición del cálculo es la espectroscopía infrarroja (IR).

La espectroscopía IR es un método con una elevada especificidad para identificar la composición de cálculos urinarios. Se basa en la interacción entre la luz infrarroja y los enlaces covalentes de los compuestos del cálculo, dando lugar a bandas de absorción específicas en función de los grupos funcionales, representadas en un espectro electromagnético.

Obtenemos un espectro IR que representa la transmitancia (%) frente al número de onda (cm^{-1}). Se identifica el compuesto mediante un proceso en dos etapas.

En la primera se identifican los grupos funcionales presentes, examinando la región de frecuencias de grupo que comprende desde 3600 hasta 1200 cm^{-1} .

La segunda etapa consiste en la comparación detallada del espectro desconocido con los espectros de los compuestos puros que contienen los grupos funcionales anteriormente detectados. Se utiliza la región de huella digital, entre 1200 y 500 cm^{-1} (Figura 2).

Las principales ventajas de esta técnica son la rapidez del análisis y la especificidad para diferenciar los componentes.

El análisis del cálculo debe realizarse en cada expulsión, independientemente de que ya se conozca la composición de cálculos anteriores en el paciente.

Otros métodos para realizar el análisis de la composición del cálculo urinario son los métodos químicos, la microscopía estereoscópica (MEST) y la difracción de rayos X.

- **Métodos químicos:**

Basados en la reactividad de determinados iones presentes en el cálculo con compuestos químicos, produciendo reacciones colorimétricas o de precipitación.

El cálculo pulverizado se pone en contacto con diferentes reactivos y se observa la reacción final.

El problema principal de este tipo de métodos es su baja sensibilidad.

- **MEST:**

Se basa en la observación mediante microscopía de la morfología del cálculo completo y de diferentes secciones de este.

Su principal inconveniente es la necesidad de personal especializado.

- **Difracción de rayos X:**

Un haz de rayos X atraviesa la muestra pulverizada generando un patrón de difracción que será específico de cada componente.

Sus principales inconvenientes son el elevado coste de la técnica y la necesidad de medidas especiales de seguridad,

TRATAMIENTO

Inicialmente se indican analgésicos potentes y rápidos, por vía parenteral asociados a antiinflamatorios.

Siempre que sea posible se intentará que el cálculo se expulse de manera espontánea, utilizando exclusivamente medidas farmacológicas. Para ello se administran relajantes de las vías urinarias (alfabloqueantes como tamsulosina),

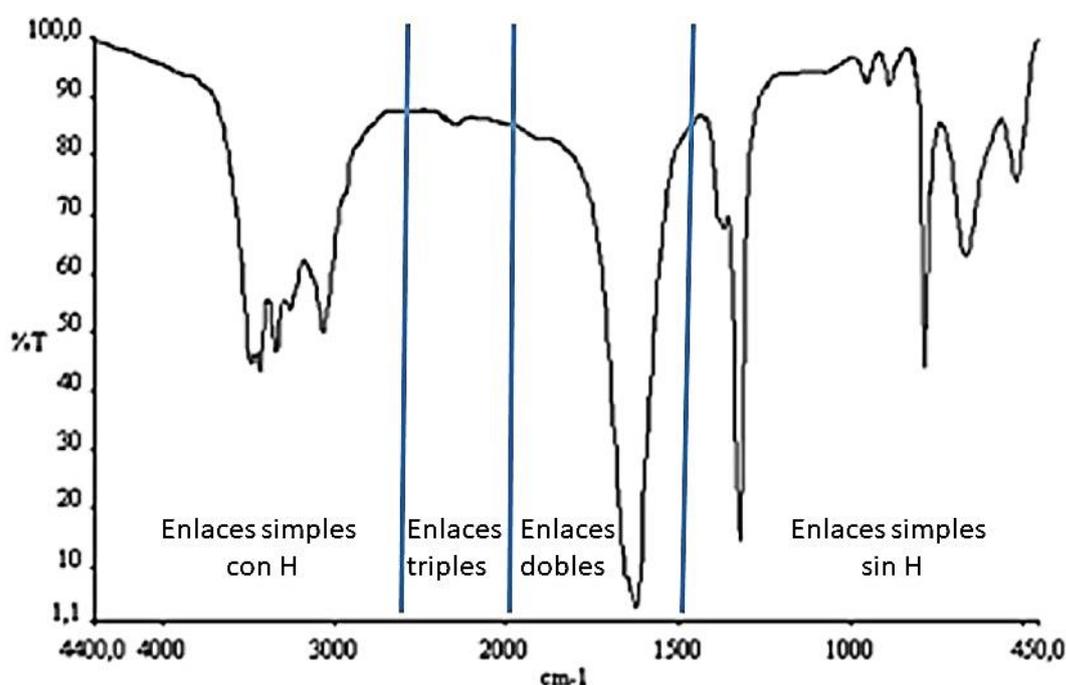


Figura 2. Modelo de espectro infrarrojo. Adaptado de: Denner S *et al*, 2008.

Hipercalciuria	Hiperoxaluria	Hiperuricosuria	Hipocitraturia	Hipomagnesuria	Cistinuria
Dieta normocálcica Tiazidas Bisfosfonatos Citrato potásico	Dieta normocálcica sin oxalato (espinacas, nabos) Tiazidas Citrato potásico	Ejercicio Reducir proteína animal y marisco Bicarbonato Alopurinol Citrato potásico	Reducir proteína animal y sal Aumentar verduras Citrato potásico	Magnesio oral	Aumentar líquidos Dieta hipoproteínica. Citrato potásico D-penicilamina

Tabla 1. Medidas profilácticas específicas para cada alteración metabólica. Adaptado de: Jalón Monzón A, 2021.

esasmolíticos y diuréticos, acompañados de ingesta de abundante agua.

La combinación con corticoides puede favorecer la expulsión espontánea mediante la disminución del edema local.

En las primeras semanas se produce la expulsión espontánea del 80% de los cálculos situados en el uréter. En caso de no producirse la expulsión en los primeros dos meses, serán necesarias otras medidas.

En la medida de lo posible se intentará eliminar el cálculo mediante medidas no invasivas como la litotricia extracorpórea con ondas de choque (LEOC) que fragmenta el cálculo de forma que las partículas obtenidas puedan ser eliminadas por orina.

Como segunda línea se utilizan las técnicas endoscópicas, entre las que destacan la ureterorenoscopia y la nefrolitotomía percutánea mínimamente invasiva. Estas técnicas destruyen el cálculo mediante láser o ultrasonidos aplicados directamente sobre la superficie del cálculo.

La cirugía convencional se utiliza en casos muy complejos o cuando fracasan el resto de los procedimientos.

Tras la expulsión del cálculo, es importante proceder al tratamiento de la patología causante.

PROFILAXIS

Debido al carácter recurrente de la patología, además de indicar un tratamiento, se deben establecer medidas profilácticas.

El paciente litiásico debe someterse a un estudio metabólico básico de orina y sangre y a una evaluación morfológica y funcional renal. En los pacientes con elevado riesgo de recidivas se indicará, además, un estudio de orina de 24 horas.

Podemos diferenciar dos tipos de pacientes: aquellos con episodios de litiasis única y los que padecen episodios litiásicos frecuentes.

En el primer caso el tratamiento profiláctico se basa en medidas generales relacionadas con el estilo de vida. Se recomienda aumentar la ingesta de líquidos, reducir de la cantidad de proteína animal y azúcares insaturados y realizar actividad física de manera regular.

Los casos de pacientes con elevada tasa de recidivas se deben, generalmente, a alteraciones metabólicas. Se realiza

un estudio y se aplican tratamientos concretos para cada alteración (Tabla 1).

CONCLUSIONES

La litiasis renal es una patología de elevada incidencia y con una alta tasa de recidivas en países desarrollados.

La función del laboratorio es fundamental para el diagnóstico de estos pacientes. Por una parte, es necesario realizar una analítica de sangre y orina en la que se da importancia principalmente a la bioquímica urinaria, análisis del sedimento y la cristaluria. Por otra parte, en el laboratorio se caracterizará la composición del cálculo una vez se produzca su expulsión.

Las pruebas de laboratorio deben ir siempre acompañadas de la historia clínica del paciente, antecedentes y pruebas de imagen para poder llevar a cabo un diagnóstico correcto.

El diagnóstico precoz de la litiasis renal es determinante para reducir las complicaciones, así como la carga sanitaria generada.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

- Goicoechea Diezhandino M. Ácido úrico y enfermedad renal crónica. Nefrología al día [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.nefrologiaaldia.org/200>.
- Belay Y, Yirdaw K, Enawgaw B. Tumor Lysis Syndrome in Patients with Hematological Malignancies. J Oncol. 2017;2017:9684909.
- Gràcia-García S, Montañés-Bermúdez R. Estudio bioquímico del paciente litiásico. El estudio de la cristaluria. Ed Cont Lab Clin [Internet]. 2018;33:53-63. <https://www.seqc.es/download/tema/24/5611/3626021/3996298/cms/tema-6-estudio-bioquimico-del-paciente-litiasico.el-estudio-de-la-cristaluria.pdf/>

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Denner S, Sobrero S, Fernández V, Brissón C, Marsili S, Taher H, et al. Espectroscopía infrarroja aplicada al análisis de los cálculos urinarios. FABICIN. 2008;12:211-19.

- García García MP, Luis Yanes MI. Litiasis renal. Nefrología al Día [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.nefrologiaaldia.org/242>.
- González Enguita C. Litiasis renal. En: Hernando Avendaño L. Nefrología clínica. 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2009. p. 567-80.
- Jalón Monzón A, Pellejero Pérez P, Álvarez Múgica M, Escaf Barmadah S. Interpretación del estudio metabólico en la litiasis renal y su tratamiento. Semergen. 2021;(47):38-46.
- Jimenez García JA, Ruiz Martín G. El Laboratorio Clínico 2: Estudio de los elementos formes de la orina. Estandarización del sedimento urinario. LABCAM (Asociación Castellano-Manchega de Análisis Clínicos); 2010.
- Lancina Martín JA, Arrabal Martín M. Enfermedades sistémicas y litiasis urinaria. Madrid: Vision Libros; 2004.
- Sienes Bailo P, Bancalero Flores JL, Santamaría González M. Espectroscopía infrarroja en la identificación de las litiasis de carbonato cálcico. Laboratory Medicine at a Glance. 2019;(12):3-6.

LÍQUIDOS BIOLÓGICOS: LÍQUIDOS SEROSOS Y LÍQUIDO SINOVIAL

Autores: Maialen Palomino Alonso*, Ylenia Pérez Arnaiz*, Alba Fernández del Pozo

**Ambas autoras han participado por igual*

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

Palabras clave: Líquidos serosos, Líquido sinovial

LÍQUIDOS SEROSOS

El concepto de líquido seroso agrupa, por presentar características similares, al líquido pleural, líquido ascítico o peritoneal y líquido pericárdico.

Son ultrafiltrados del plasma localizados dentro de cavidades delimitadas por dos membranas serosas, la parietal (que recubre la cavidad corporal) y la visceral (situada alrededor del órgano en cuestión). Estas membranas están constituidas por una capa de tejido conjuntivo con abundantes capilares y vasos linfáticos, además de una capa de células mesoteliales. Los líquidos se forman en esta red capilar mediante un proceso de ultrafiltración, donde intervienen las presiones hidrostáticas y coloidosmóticas tanto del capilar como del intersticio, además de la permeabilidad capilar (Figura 1). Posteriormente se reabsorbe vía linfática, manteniéndose un volumen constante gracias a este equilibrio de formación/reabsorción.

La función de los líquidos serosos es proporcionar lubricación y permitir el movimiento de las vísceras.

Fisiológicamente, el volumen de líquido seroso contenido en las cavidades corporales es reducido. Cualquier incremento se considera patológico y es conocido como derrame.

Los derrames se producen como consecuencia de una alteración de los mecanismos fisiológicos responsables de la formación o absorción del líquido seroso, acumulándose en la cavidad. Entre las causas que lo provocan se encuentran:

- Aumento de la presión hidrostática, como en casos de insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) o cirrosis hepática.

- Disminución de la presión coloidosmótica en situaciones de hipoproteinemia.
- Aumento de la permeabilidad capilar, derivada de infecciones e inflamaciones.
- Obstrucción del drenaje linfático, asociado a tumores u otras etiologías.

Clásicamente, los líquidos biológicos se han diferenciado, según su contenido proteico, en trasudados y exudados.

- **Trasudados.** Se trata de líquidos no inflamatorios de causa sistémica, que se originan por aumento de la presión hidrostática o disminución de la presión coloidosmótica. Un derrame de tipo trasudado se caracteriza por ser de elevado volumen y presentar al mismo tiempo baja concentración de proteínas y baja celularidad (hematíes, leucocitos mononucleares y células mesoteliales). La concentración de lactato deshidrogenasa (LDH) se encuentra disminuida y la glucosa es similar a la plasmática. No requieren más estudios adicionales.
- **Exudados.** Son líquidos inflamatorios generados por un aumento en la permeabilidad capilar, debido a alteraciones que implican directamente a las estructuras de la superficie de determinadas cavidades corporales: mesotelio, vasos linfáticos y capilares. Se caracterizan por una elevada concentración de proteínas y de LDH. Además, suelen cursar con presencia de células como hematíes, leucocitos mononucleares y polimorfonucleares, células mesoteliales, pudiendo aparecer también células tumorales, que consumen la

FUERZAS QUE DETERMINAN LA FILTRACIÓN EN LOS CAPILARES SANGUÍNEOS

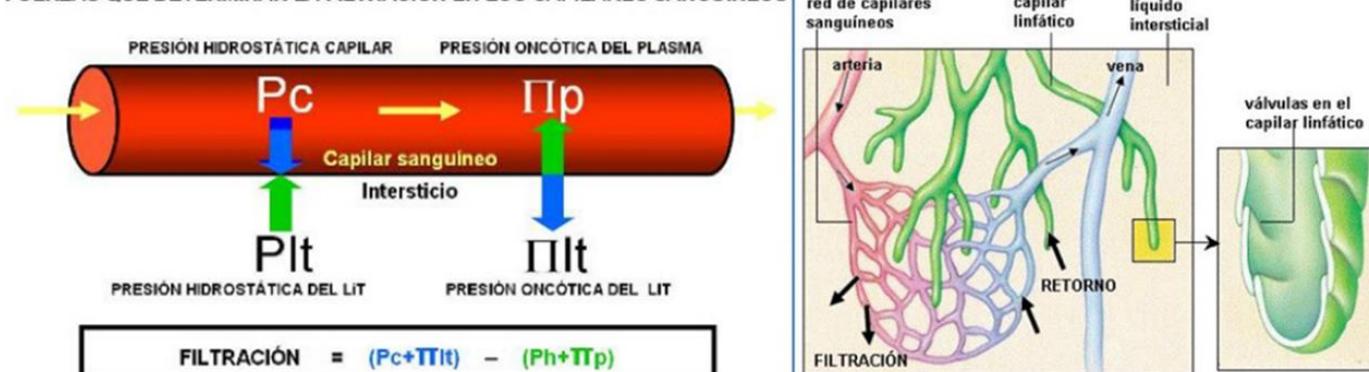


Figura 1. Factores que determinan la filtración en los capilares sanguíneos: a favor de la filtración está la presión hidrostática del capilar y la presión oncótica del intersticio; se oponen a la filtración la presión oncótica del plasma y la presión hidrostática del intersticio. La permeabilidad vascular también influye en la correcta filtración y la reabsorción linfática es necesaria para mantener un volumen constante. Adaptado de: Merino A, 2017.

glucosa presente. Requiere un estudio en profundidad para determinar la etiología del derrame.

El estudio de los líquidos serosos es similar entre ellos. Un alto porcentaje de las peticiones, cercano a la totalidad, incluyen recuento celular, estudio bioquímico y microbiológico, pudiéndose ampliar con estudio anatomopatológico y otras determinaciones en función de la sospecha de la etiología del derrame.

En primer lugar, hay que tener en cuenta que la muestra debe recogerse en tubos específicos según las pruebas a realizar:

- Recuento celular: recogida en tubo con anticoagulante EDTA-K3 que conserva la estructura celular, o en un recipiente sin aditivos*.
- Estudio bioquímico: recolección en tubo con anticoagulante heparina de litio o en recipiente sin aditivos*.

*Tanto para el recuento celular como para el estudio bioquímico es preferible emplear tubos con anticoagulante para evitar la coagulación durante el envío ya que podría invalidar la muestra.

- Medición pH: el contenedor de la muestra debe ser una jeringa heparinizada, y se debe mantener en todo momento las condiciones anaeróbicas, siendo necesario el análisis de la muestra durante la primera hora tras la obtención.

- Estudio microbiológico: es imprescindible la recogida en un recipiente estéril.
- Estudio anatomopatológico: recolección en recipiente estéril.

Una vez recibida la muestra en el laboratorio el estudio consiste en:

1. Estudio macroscópico: analizando el aspecto del líquido se puede obtener una sospecha diagnóstica.
2. Estudio microscópico.
 - Recuento celular. Aunque el método de referencia para el recuento celular es el recuento manual en cámaras citométricas (Neubauer, Burkner o Thoma), es un método lento, que requiere de personal cualificado y presenta variabilidad inter-observador, pudiendo generar errores. Es por ello que la automatización ha ganado cada vez más terreno, ya que facilita el proceso, lo estandariza y mejora la precisión. En este caso es estrictamente necesario asegurar que el equipo realiza recuentos fiables.
 - Análisis citológico. En caso de incongruencias en los resultados aportados por el analizador, es imprescindible el estudio al microscopio óptico del líquido, tras citocentrifugación y tinción, con el fin de confirmar el recuento diferencial. Además, en caso de sospecha de malignidad, este estudio es recomendable para ratificar la presencia de células

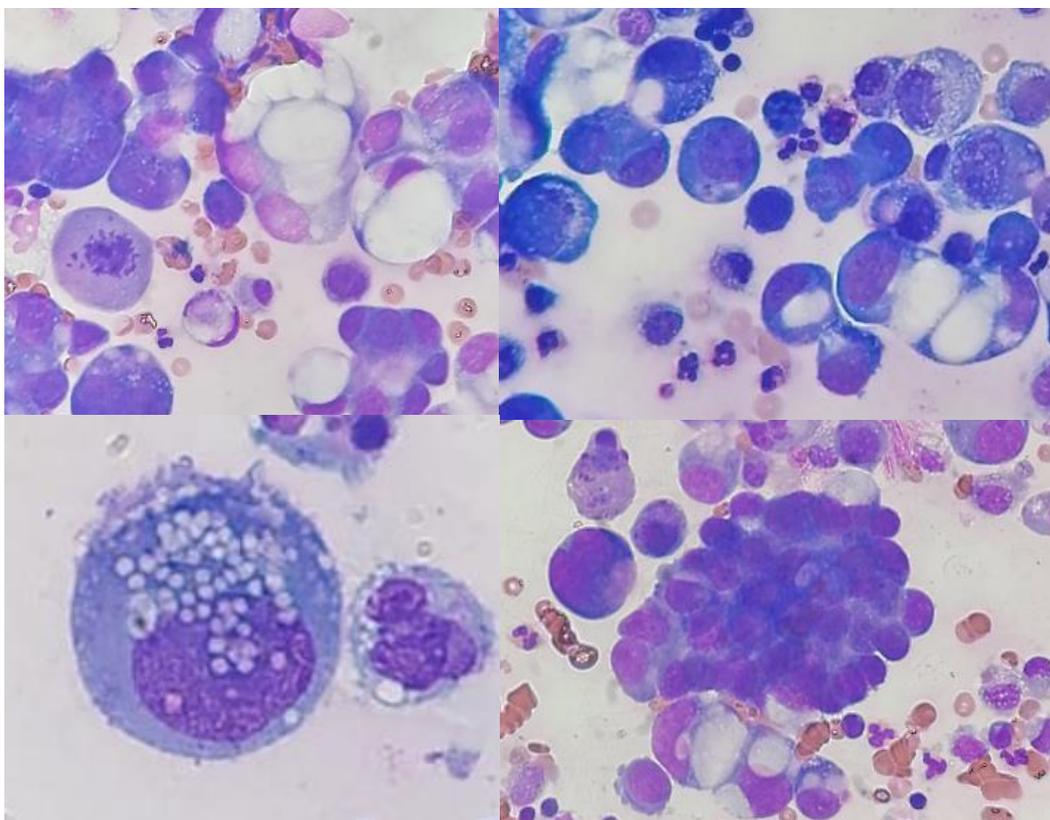


Figura 2. Células atípicas presentando como características: gran basofilia, tamaño celular polimorfo y contorno irregular. Son multinucleadas, con relación núcleo/citoplasma alta y frecuente aparición de mitosis aberrantes. Tendencia a formar nidos celulares y a constituir sincitio, donde no se distinguen los límites entre células. Frecuentemente presentan grandes vacuolas o gránulos de secreción. Elaboración propia.

atípicas (Figura 2) y sugerir la realización de estudios anatomopatológicos.

- Estudio bioquímico, donde se determinarán parámetros urgentes y otros adicionales.

- Líquido pleural**

- Generalidades**

La cavidad pleural es el espacio entre dos membranas serosas, la pleura parietal y la pleura visceral. La pleura es una membrana serosa de origen mesodérmico que recubre principalmente los pulmones (pleura visceral), y delimita con la pared torácica, el diafragma y el mediastino (pleura parietal).

El líquido pleural (LP) contenido en esta cavidad presenta una doble función: facilitar el movimiento de los pulmones y evitar el colapso pulmonar, gracias a la presencia de una presión intrapleural negativa.

En condiciones normales, el volumen de LP oscila entre 1 y 10 mL. Todo acúmulo se considera patológico, pudiendo reflejar una enfermedad pleural, pulmonar o extrapulmonar.

A nivel de la cavidad pleural, pueden existir distintas patologías:

- Neumotórax: presencia de aire.
- Hemotórax: presencia de sangre.
- Hemoneumotórax: presencia de sangre y aire.
- Empiema pleural: presencia de pus.
- Derrame pleural: presencia de líquido. Una de las causas más frecuentes de derrame pleural es la ICC. Entre los síntomas sugestivos de esta patología destacan dolor local, tos seca y disnea.

- Recolección de la muestra**

El procedimiento de obtención de la muestra se denomina toracocentesis, la cual puede realizarse con finalidad diagnóstica para determinar la causa del derrame, o evacuadora para disminuir la sintomatología.

- Estudio del líquido pleural**

El primer objetivo del abordaje del estudio del LP es la distinción entre exudado y trasudado. En 1972 el Dr. Light utilizó como magnitudes bioquímicas las proteínas totales y LDH en LP y suero, dando lugar a un algoritmo diagnóstico conocido como criterios de Light, que clasifica correctamente el 99% de los derrames. Posteriormente se han ido estudiando otras magnitudes bioquímicas para poder realizar una clasificación más exhaustiva, recogiendo todos los parámetros en la tabla 1.

En caso de que el derrame sea tipo trasudado, no se requieren estudios adicionales. Sin embargo, si se trata de un exudado es necesario investigar la etiología del derrame. Este estudio comprenderá el análisis del aspecto macroscópico del líquido, el estudio microscópico donde se realizará recuento celular y, en caso de ser necesario, el diferencial leucocitario, y la medición de distintos parámetros bioquímicos.

- Estudio macroscópico**

El color y turbidez de la muestra puede orientar la sospecha del derrame.

Fisiológicamente, el LP es de aspecto claro y amarillo pálido. En caso de turbidez se sospecha de presencia de células o de lípidos. La presencia de células (leucocitos) se asocia a infección o trastornos sistémicos, como artritis reumatoide. La turbidez asociada a lípidos hará que el LP tenga apariencia lechosa, como en casos de quilotórax o pseudoquilotórax. Líquidos sanguinolentos pueden ser consecuencia de un hemotórax o una punción traumática. Otras características menos frecuentes pero que se pueden observar son colores castaños (rupturas abscesos hepáticos amebianos) o negros (aspergilosis).

- Estudio microscópico**

- Eritrocitos:** fisiológicamente están ausentes. En casos de líquidos hemorrágicos (>100.000 células/mm³) es necesario medir el hematocrito con el fin de discernir si existe hemotórax por punción traumática. Si el resultado es superior al 50% es diagnóstico de hemotórax, y

		TRASUDADO	EXUDADO
Criterios de Light	Proteínas (LP/Suero)	<0.5	>0.5
	LDH (LP/Suero)	<0.6	>0.6
	LDH	< $\frac{2}{3}$ valor superior del IR en suero	> $\frac{2}{3}$ valor superior del IR en suero
Colesterol (LP/Suero)		<0.3	>0.3
Colesterol (mg/dL)		<45-60	>45-60
Bilirrubina (LP/Suero)		<0.6	>0.6
Albúmina (diferencia suero - LP)		>12 g/L	<12 g/L

Tabla 1. Criterios de Light y otras magnitudes bioquímicas utilizadas para la clasificación del líquido pleural en trasudado o exudado Adaptado de: Merino A, 2017.

puede asociarse a neoplasias, traumatismos o embolia pulmonar.

2. **Leucocitos.** Un LP no patológico presenta una concentración de leucocitos inferior a $250/\text{mm}^3$, con un predominio de células mononucleares (linfocitos y macrófagos). Cuando la concentración se supera, es aconsejable realizar un recuento diferencial.

La mayoría de los trasudados poseen una concentración inferior a $1.000 \text{ células}/\text{mm}^3$, frente a los exudados donde es superior a 1.000. En cuanto al recuento diferencial, un porcentaje de neutrófilos superior al 50% orienta hacia un proceso agudo, mientras que un porcentaje de células mononucleadas mayor al 50% orienta hacia un proceso crónico. La presencia de eosinófilos se asocia a casos de neumotórax y hemotórax, infecciones parasitarias o reacciones alérgicas y su ausencia excluye tuberculosis

– **Magnitudes bioquímicas**

1. Urgentes

- 1.1. **pH:** fisiológicamente oscila entre 7.60-7.66 por la acumulación de bicarbonato. Este parámetro es de utilidad para el diagnóstico diferencial de exudados, donde habitualmente disminuye hasta 7.30-7.45. Valores por debajo de 7.30 se asocian a complicaciones de derrames paraneumónicos, empiemas, tuberculosis, neoplasias, roturas esofágicas, derrames reumatoideos o hemotórax.
- 1.2. **LDH:** utilizada como criterio de Light, además de reflejar el grado de inflamación pleural. Valores por encima de 1000 UI/L se asocian a neumonías de mala evolución, tuberculosis o malignidad.
- 1.3. **Glucosa:** debido a que es un ultrafiltrado, el LP presenta valores similares a los de plasma. Valores inferiores a 60mg/dL son sugestivos de infecciones, inflamaciones reumatoideas, derrame paraneumónico o neoplasias.
- 1.4. **Amilasa:** un cociente líquido/suero superior a 1 sugiere enfermedad pancreática, neoplasia o rotura esofágica.

2. Parámetros bioquímicos adicionales

- **Adenosina Desaminasa (ADA):** esta enzima es necesaria para la diferenciación de las células linfoides e interviene en la maduración de los monocitos/macrófagos. Un resultado de ADA superior a 45 UI/L, junto con un predominio linfocitario, es sugestivo de tuberculosis y por encima de 70 es confirmatorio
- **Triglicéridos:** útiles en el diagnóstico de quilotórax. Es confirmatorio cuando se encuentran por encima de 110mg/dL o hay presencia de quilomicrones.
- **Colesterol:** útil para la clasificación de trasudados o exudados, presentándose por encima de 60mg/dL en estos últimos. Además, valores por encima de 200mg/dL se asocian a pseudoquilotórax, junto con un ratio colesterol/triglicéridos superior a 1, que en

caso de presentar cristales al microscopio es patognomónico de enfermedad.

- **Marcadores tumorales (CEA, Ca15.3, Ca125, CYFRA21-1).** La elevación de estos marcadores en suero junto a un ratio líquido/suero superior a 1.2, orientan hacia malignidad.
- **Factor reumatoide:** para pleuritis reumatoideas.

• **Líquido ascítico o peritoneal**

– **Generalidades**

El peritoneo es la membrana que reviste tanto la cavidad abdominal como las vísceras abdominales.

Para garantizar la correcta lubricación de la superficie peritoneal y el movimiento visceral, el peritoneo se encuentra rodeado de un ultrafiltrado del plasma denominado líquido ascítico o peritoneal.

Se trata de un líquido estéril, transparente y de color amarillo claro que presenta una densidad menor de 1.016 mg/dL. La concentración de proteínas debe ser inferior a 2.5 g/dL, siendo albúmina en su mayoría, y debe presentar menos de $250 \text{ células}/\text{mm}^3$, siendo estas mayoritariamente macrófagos, linfocitos o células mesoteliales.

La acumulación de un volumen de líquido ascítico superior a 50 mL en la cavidad abdominal es lo que se conoce como ascitis y entre las causas que la provocan encontramos procesos extraperitoneales y enfermedad peritoneal propiamente dicha.

La ascitis puede ser provocada por distintas causas, entre la que destaca la hipertensión portal. Esta comprende el conjunto de signos y síntomas que aparecen como resultado de una elevación patológica y continuada de la presión hidrostática en la red venosa portal. La hipertensión portal puede estar provocada por cirrosis hepática, insuficiencia hepática aguda, hepatitis aguda crónica e insuficiencia cardíaca, entre otras patologías. Además, una disminución de albúmina en sangre (hipoalbuminemia), provocada por síndrome nefrótico o desnutrición; enfermedades intestinales y del peritoneo, enfermedades pancreáticas y enfermedades ginecológicas también pueden provocar ascitis.

– **Recolección de la muestra**

El líquido ascítico se extrae mediante un procedimiento llamado paracentesis abdominal, con finalidad diagnóstica y/o evacuadora.

– **Estudio macroscópico**

Resulta de especial interés la observación macroscópica del líquido ya que aporta información relevante acerca de la etiología del derrame, facilitando la orientación del diagnóstico.

Ante infecciones bacterianas aparecen líquidos turbios y purulentos. Líquidos hemorrágicos pueden corresponder a traumatismos, tuberculosis o procesos malignos, mientras que líquidos verdosos se observan ante contaminación biliar. Líquidos lechosos o quillosos se deben al aumento de triglicéridos y quilomicrones, respectivamente, causados por traumatismos o bloqueo de los vasos linfáticos.

– Estudio microscópico

1. **Eritrocitos:** fisiológicamente ausentes. En caso de líquidos hemorrágicos, concentraciones de hematíes por encima de 100.000 células/mm³, son indicativos de lesiones por traumatismos cerrados (en paracentesis abdominal es poco frecuente que la punción sea traumática). Si la concentración de hematíes es superior a 20.000 células/mm³, pero inferior a 100.000 células/mm³, puede tratarse de una ascitis neoplásica o un carcinoma peritoneal.
2. **Leucocitos:** fisiológicamente presenta una concentración de leucocitos inferior a 250 células/mm³, con predominio mononuclear (linfocitos y macrófagos). Si la concentración de leucocitos se ve aumentada, es necesario realizar un recuento diferencial para conocer el predominio de poblaciones leucocitarias. Si predominan neutrófilos, se podrá sospechar de peritonitis bacteriana espontánea, mientras que, si el predominio es linfocitario, la etiología del derrame podría ser tuberculosa o por carcinomatosis peritoneal

– Magnitudes bioquímicas

1. Urgentes

- 1.1. **Albúmina:** el gradiente de albúmina suero-líquido, también conocido como GASA ([Albúmina]_{sérica} - [Albúmina]_{líquido ascítico}), es útil para conocer la etiología del derrame ya que correlaciona adecuadamente con la presencia de hipertensión portal. Valores elevados de gradiente (>11 g/dL) aparecen en líquidos no inflamatorios o trasudados. Por el contrario, los exudados o líquidos inflamatorios presentan valores disminuidos de gradiente (<109 g/dL).
- 1.2. **pH:** oscila entre 7'35 y 7'59, siendo significativamente más bajo en ascitis de etiología infecciosa.
- 1.3. **Proteínas totales:** resultan de especial utilidad para realizar un diagnóstico diferencial entre peritonitis bacteriana espontánea y perforación intestinal. Niveles superiores a 3 g/dL son indicativos de exudados, mientras que niveles inferiores a 3 g/dL corresponden a trasudados
- 1.4. **Glucosa:** presenta valores similares al suero. Concentraciones disminuidas orientan hacia peritonitis bacteriana espontánea, peritonitis tuberculosa, perforación intestinal y neoplasias, donde la glucosa se consume por una concentración celular elevada.
- 1.5. **LDH:** para el estudio de LDH se debe tener en cuenta el ratio $LDH_{líquido}/LDH_{suero}$ siendo los cocientes mayores de 1 indicativos de infección grave o neoplasia.
- 1.6. **Amilasa:** también se tiene en cuenta el ratio $amilasa_{líquido}/amilasa_{suero}$. Valores inferiores a 1 orientan hacia ascitis cirrótica no complicada mientras que valores superiores a 5, son indicativos de ascitis pancreática.

2. Parámetros bioquímicos adicionales:

- 2.1. **Creatinina y urea:** se determinan de forma conjunta ante sospecha de extravasación de orina a la cavidad peritoneal o para descartar punción vesical en la paracentesis abdominal.
- 2.2. **Colesterol:** la presencia de colesterol en líquido ascítico suele orientar a un derrame de tipo pseudoquiloso.
- 2.3. **Triglicéridos:** la presencia de triglicéridos en líquido ascítico orienta a un derrame de tipo quiloso (ascitis quilosa) cuando la concentración de triglicéridos en líquido ascítico es superior a 200 mg/dL y la ratio $\text{triglicéridos}_{líquido}/\text{triglicéridos}_{suero}$ es mayor a 1.
- 2.4. **Adenosina deaminasa (ADA):** valores de ADA superiores a 35 U/L son indicativos de peritonitis tuberculosa.
- 2.5. **Marcadores tumorales:** la medición de distintos marcadores tumorales en líquido ascítico tales como CEA, CA 125 o CYFRA 21-1 aportan información diagnóstica de los derrames de origen maligno, cuando se encuentran elevados y el ratio líquido/suero es superior a 1.2.

• Líquido pericárdico

– Generalidades

El pericardio constituye las membranas fibrosas que rodean completamente al corazón. El pericardio visceral se encuentra en contacto con el epicardio y el pericardio parietal separa al corazón del resto de órganos mediastínicos. El espacio entre estas membranas contiene el líquido pericárdico que actúa como lubricante en la contracción cardíaca.

La acumulación de líquido pericárdico es lo que se conoce como derrame pericárdico. Puede ser consecuencia de distintas alteraciones vasculares como disección de aorta, trastornos metabólicos como hipotiroidismo o uremia, enfermedades autoinmunes, infecciones víricas o bacterianas, neoplasias y traumatismos.

– Recolección de muestra

El líquido pericárdico se extrae mediante un procedimiento denominado pericardiocentesis, cuyo objetivo es su estudio para conocer la etiología de un derrame pericárdico.

– Estudio macroscópico

Fisiológicamente, el líquido pericárdico debe presentar un aspecto claro y un color amarillo pálido.

En procesos malignos o infecciones es común encontrar un líquido pericárdico turbio. La presencia de sangre es habitual en procesos malignos. Ante líquidos macroscópicamente hemáticos, es necesario descartar que se haya puncionado el miocardio de forma accidental. Por último, el aspecto lechoso puede deberse a derrames quilosos o pseudoquilosos.

– Estudio microscópico

1. **Eritrocitos:** fisiológicamente ausentes. La presencia de hematíes en líquido pericárdico sugiere un sangrado como etiología del derrame. Además, si el líquido es hemorrágico, es necesario medir el hematocrito para descartar punción del miocardio (en este caso, el hematocrito del líquido es similar al de la sangre periférica).
2. **Leucocitos:** fisiológicamente debe presentar una concentración de leucocitos inferior a 250 células/mm³, con predominio mononuclear (linfocitos y macrófagos). Ante la sospecha de infección bacteriana es importante conocer la concentración de leucocitos, siendo una concentración mayor de 1.000 leucocitos/mm³ con predominio de polimorfonucleares, sugestivo de endocarditis bacteriana.

– Magnitudes bioquímicas

1. Urgentes

- 1.1. **Glucosa:** al igual que en el resto de líquidos serosos, esta debe interpretarse junto con la glucosa sérica. Niveles de glucosa por debajo de 35 mg/dL suelen asociarse a pericarditis bacteriana, pericarditis tuberculosa, artritis reumatoide y neoplasias.
- 1.2. **Proteínas:** la determinación de la concentración proteica en líquido pericárdico es de utilidad para la clasificación del líquido en trasudado o exudado siguiendo los criterios de Light.
- 1.3. **pH:** en trasudados el pH suele ser similar al pH fisiológico, viéndose disminuido en derrames tipo exudados.
- 1.4. **LDH:** útil como marcador de inflamación. Valores elevados de LDH orientan hacia un derrame tipo exudado.

2. Parámetros bioquímicos adicionales:

- 2.6. **ADA:** una concentración de adenosin deaminasa >40 UI/L es útil para confirmar un derrame tuberculoso.
- 2.7. **CEA:** útil para diagnosticar derrames de etiología neoplásica.

LÍQUIDO SINOVIAL

• Generalidades

El líquido sinovial es un fluido transparente y viscoso localizado en las cavidades articulares. Es un ultrafiltrado del plasma rico en ácido hialurónico, producido por los sinoviocitos, siendo este mucopolisacárido el que le confiere la viscosidad característica, facilitando la lubricación de las articulaciones y actuando como medio nutricional del cartílago.

En condiciones fisiológicas, todas las articulaciones móviles (diartroidales) contienen una pequeña cantidad de líquido sinovial. La acumulación de éste es lo que se conoce como derrame articular y puede ser ocasionado por distintos trastornos entre los que se encuentran la artritis reumatoide, la artritis infecciosa, la gota, la artrosis o los traumatismos.

El estudio del líquido sinovial permite conocer la etiología de la inflamación articular o artritis.

• Recolección de muestra

El procedimiento de obtención de líquido sinovial se conoce como artrocentesis o punción articular y su finalidad puede ser diagnóstica, para conocer la causa del derrame, o evacuadora, con el fin de disminuir la sintomatología.

• Estudio macroscópico

Una articulación normal debe albergar un volumen de líquido sinovial inferior a 3,5 mL. Este ha de ser claro e incoloro o amarillo pálido. La viscosidad tiene que ser alta, siendo capaz de formar un filamento de entre 4 y 6 cm de largo. Disminuciones en la viscosidad pueden indicar situaciones inflamatorias, debido a que los neutrófilos liberan enzimas digestivas como la hialuronidasa.

• Estudio microscópico

– Estudio citológico

El líquido sinovial no debe presentar hematíes ni más de 200 leucocitos/mm³. Una celularidad mayor a 50.000 leucocitos/mm³ con predominio polimorfonuclear es típica de infección articular o artritis séptica. Los derrames sinoviales causados por agentes mecánicos, como traumatismos, no suelen presentar más de 3.000 leucocitos/mm³, siendo el porcentaje de polimorfonucleares inferior al 25%.

– Estudio de cristales

Según la sospecha clínica, en ocasiones puede resultar necesario valorar la presencia de microcristales. Los cristales en líquido sinovial pueden aparecer como consecuencia de distintos trastornos metabólicos, por una disminución de la excreción renal de sustancias que se acumulan en sangre y que pueden cristalizar, por degeneración del cartílago y hueso articular o por inyecciones de medicamentos, como corticoesteroides, en la articulación.

Los cristales se identifican en función de la morfología y de la birrefringencia. La morfología puede estudiarse empleando un microscopio óptico, pero para valorar la birrefringencia es necesario el empleo de un microscopio de luz polarizada.

Se pueden encontrar distintos tipos de cristales en líquido sinovial:

1. **Urato monosódico:** presentan forma de agujas y una alta birrefringencia. Suelen aparecer tanto de forma extracelular como intracelular en el interior de neutrófilos. Aparecen en el 90% de los casos agudos de gota.
2. **Pirofosfato cálcico:** presentan forma alargada o romboidal y es típico de los ataques de pseudogota. Es común encontrarlos en el interior celular, en concreto dentro de las vacuolas de los neutrófilos.
3. **Corticosteroides:** muestran forma de placas planas con formas desiguales. Es común que aparezcan en líquido

sinovial de pacientes a los que se le ha infiltrado este fármaco intraarticularmente. Pueden persistir un mes tras la inyección.

- **Magnitudes bioquímicas**

- **Urgentes**

1. **Glucosa:** la concentración fisiológica de glucosa en líquido sinovial oscila entre 3,5 y 5,3 mmol/L, viéndose disminuida en casos de sepsis o de líquido inflamatorio.
2. **Proteínas:** a diferencia de los líquidos serosos, en el estudio de líquido sinovial no se emplea la concentración de proteínas totales para diferenciar entre líquidos inflamatorios de no inflamatorios. Fisiológicamente, la concentración debe ser inferior a 30 g/L, elevándose en el caso de líquidos sépticos, inflamatorios y hemáticos.
3. **LDH:** la concentración de LDH aumenta en líquidos sinoviales sépticos, inflamatorios y hemáticos.

- **Parámetros bioquímicos adicionales**

1. **Ácido úrico:** la medición de ácido úrico en líquido sinovial resulta de utilidad para confirmar el diagnóstico de gota cuando no se puede demostrar la presencia de cristales.
2. **Complemento:** una disminución de un 30% del complemento con respecto a la concentración plasmática es indicativo de sinovitis vírica o artritis reumatoide.
3. **β2-microglobulina:** aumentada en artritis reumatoide.

- Tejedor Hernández E, Mosquera Parrado M, Merino A. Estudio de líquidos serosos. En: Asociación Española de Biopatología Médica (AEBM), editor. Manual de urgencias del laboratorio clínico 2013. Madrid: AEBM; 2013. p. 242-51.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Damiano J, Bardin T, Ea HK. Líquido sinovial normal y patológico. EMC Podología. 2019;21(2):1-12.
- González Hernández A, Alegre Martínez E, Monreal Marquiegui I, Mugueta Uriaque C, Restituto Aranguibel P, Varo Cenarruzabeitia N. Líquidos biológicos. En: González A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. Barcelona: Elsevier; 2014. p. 145-52.
- Martínez-Castillo A, Núñez C, Cabiedes J. Análisis de líquido sinovial. Reumatol Clín. 2010;6(6):316-21.
- Merino A, Marín JL. Citología y bioquímica de los líquidos biológicos. Ed Cont Lab Clín. 2017;28:112-35.
- Padrós Soler G, Galán Ortega A, Guillén Campuzano E, Hortas Nieto ML, Soria M, Muñoz Pérez M, et al. Recomendaciones para el estudio del líquido sinovial. Quim Clín. 2004;23(6):434-38.
- Porcel Pérez JM. ABC del líquido pleural. Semin Fund Esp Reumatol. 2010;11(2):77-82.
- Strasinger SA, Di Lorenzo MS. Análisis de orina y de los líquidos corporales. 5ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2010.

BIOMARCADORES EN COVID-19: SUPAR (RECEPTOR SOLUBLE DEL ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO TIPO UROQUINASA)

Autores: Eva Berruga Torres; Elena Ana López Jiménez

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

Palabras clave: COVID-19, biomarcadores, suPAR

LA PANDEMIA DE COVID-19

La pandemia ocasionada por la COVID-19 ha supuesto una emergencia sanitaria, social y económica a nivel global.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹, los casos confirmados de COVID-19 en todo el mundo, acumulados hasta el 18 de octubre de 2021, superan los 240 millones, y las muertes, los 4 millones.

Esta enfermedad, causada por el nuevo coronavirus SARS-COV-2 (Síndrome respiratorio agudo grave), se transmite por las vías aéreas a través del contacto con pequeñas gotas respiratorias y aerosoles, y presenta un periodo de incubación de entre 4 y 5 días antes de la aparición de los síntomas. Estos síntomas van desde tos seca, fiebre y dificultad para respirar, hasta síntomas gastrointestinales, neurológicos o musculares^{2,3}. La mayoría de los pacientes presentan síntomas leves, sin embargo, algunos pueden desarrollar un fallo respiratorio grave que requiere su ingreso en UCI y uso de ventilación mecánica; así como fallo multiorgánico⁴.

La gran variedad de síntomas, muchos de ellos inespecíficos, así como la existencia de casos asintomáticos, hace esencial el desarrollo de técnicas de diagnóstico que permitan identificar de forma inequívoca la COVID-19 en estados tempranos⁵.

El diagnóstico actual se basa en los signos clínicos, análisis de sangre, radiología y análisis molecular e inmunológico. De todos ellos, la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en tiempo real (RT-PCR) es el método *gold standard*. Sin embargo, existen distintos factores que pueden afectar a su sensibilidad, como el tipo de muestra y el momento de su recogida. Así mismo, es de gran importancia

tener en cuenta la posibilidad de obtener falsos negativos con este método cuando la carga viral es muy baja³.

Por otra parte, la detección temprana de pacientes COVID-19 con un peor pronóstico es esencial para reducir la mortalidad y optimizar los recursos médicos. Es por eso por lo que la búsqueda de recursos pronósticos se ha convertido en una prioridad en esta pandemia.

RESPUESTA INMUNE FRENTE AL SARS-COV-2

El virus SARS-COV-2 reconoce la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), que actúa como su receptor para adherirse y entrar en las células, especialmente en las del epitelio respiratorio⁶. Esta unión se realiza a través de la proteína de espícula del virus, y depende de la serina proteasa transmembrana serina 2 o TMPRSS2, que posibilita la fusión de la envoltura viral y la membrana celular. Esto permite la entrada del RNA viral en la célula huésped para su traducción y replicación^{7,8}.

La respuesta inmune en pacientes con COVID-19 es más compleja a medida que la enfermedad evoluciona a formas más graves, y consta de la respuesta innata y la adaptativa⁷ (Figura 1).

• Respuesta inmune innata

Se desencadena cuando el virus es reconocido por receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) en las células diana, principalmente los neumocitos. Al infectarse las células epiteliales, el virus puede inducir la lisis de las células como parte de su ciclo de replicación, dañando el epitelio. Los macrófagos y células dendríticas son activados, comenzando a liberar citoquinas proinflamatorias y quimioquinas. Ese aumento de citoquinas proinflamatorias

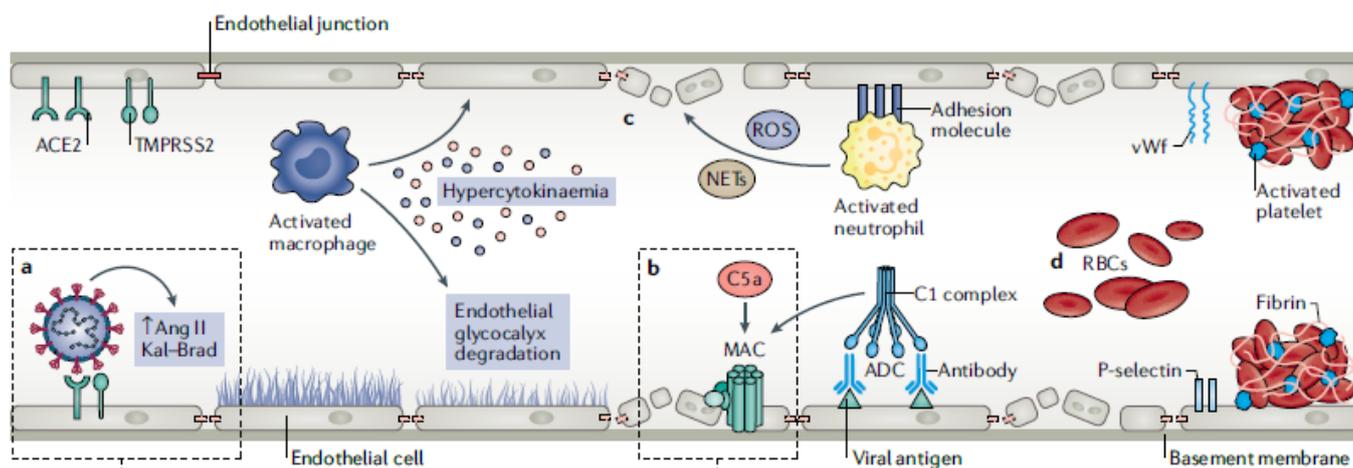


Figura 1. Efecto del SARS-COV-2 sobre la función endotelial, sistema de coagulación y trombosis. Adaptado de: Perico *et al*, 2020.

desemboca en un reclutamiento de leucocitos, estimulando la respuesta adaptativa y la inflamación local en los pulmones.

- **Respuesta inmune adaptativa**

En este punto se produce infiltración vascular de linfocitos CD8+, CD4+ y NK. La fagocitosis de células infectadas y la presentación de antígenos activa los linfocitos CD8+; y tanto los linfocitos CD8+ como NK pueden mostrar actividad citotóxica e inducir la apoptosis de las células infectadas. Por otra parte, los linfocitos CD4+ median la progresión de células B como células plasmáticas productoras de anticuerpos.

En la mayoría de los pacientes, esta respuesta conjunta es suficiente para erradicar la infección y la enfermedad se manifiesta con sintomatología leve o moderada.

Sin embargo, en otros casos el sistema inmune se desregula dando lugar a formas más graves de la enfermedad, especialmente en pacientes que presentan comorbilidades⁹.

- **Síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA)**

La elevada mortalidad de la COVID-19 se debe principalmente al resultado de un síndrome de distrés respiratorio agudo, que se manifiesta con fallo respiratorio hipoxémico y aparición de opacidades bilaterales alveolares en radiografías de tórax⁸.

Se caracteriza por una inflamación persistente que aumenta el daño epitelial, la permeabilidad de las células de capilares endoteliales y la filtración vascular en los pulmones (Figura 1). El daño endotelial da lugar a una desregulación de la hemostasia, a la unión masiva de plaquetas, trombosis y coagulación intravascular diseminada. Además, se presenta linfopenia y una desregulación de las subpoblaciones leucocitarias, ambas condiciones asociadas a peor pronóstico^{7,10}. Al reducirse la actividad citotóxica, se produce mayor liberación del virus, lo que lleva a un aumento de la actividad de macrófagos y neutrófilos, con una sobreproducción de citoquinas. Este proceso conocido como "tormenta de citoquinas" favorece el círculo vicioso de daño vascular, coagulación y trombosis por la degradación del glicocálix endotelial. La infiltración de neutrófilos produce mediadores histotóxicos, como las especies reactivas de oxígeno (ROS)^{10,11}. Además, la unión del virus a ACE2 da lugar a una desregulación del sistema renina-angiotensina,

que puede provocar vasoconstricción y contribuir al estrés oxidativo e hiperinflamación¹².

La relación entre coagulación e inflamación ha sido ampliamente descrita y se sabe que los mediadores de inflamación participan en la coagulación, de la misma forma que el sistema de coagulación participa en la inflamación. De hecho, la COVID-19 se ha asociado a mayor riesgo de trombos, estado hipercoagulable y trombocitopenia¹³. Además, la activación de las vías de coagulación también puede contribuir a la hiperproducción de citoquinas¹⁴.

En este contexto, cabe destacar la importancia del sistema activador de plasminógeno (PA), un sistema enzimático proteolítico extracelular, cuya función principal es la activación de plasminógeno a plasmina, que produce la degradación de la fibrina.

SISTEMA ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO

La activación de plasminógeno se realiza a través de dos tipos de activadores tipo serín proteasa, tPA (activador tisular de plasminógeno) y uPA (activador de plasminógeno tipo uroquinasa). Estos dos activadores se encuentran regulados principalmente por los inhibidores del activador de plasminógeno PAIs (PAI-1 y PAI-2). Por otro lado, los principales inhibidores de la plasmina son la α 2-macroglobulina y α 2-antiplasmina.

Aunque ambos activadores dan lugar a la activación del plasminógeno, uPA participa principalmente en degradación tisular, mientras que el tPA lo hace en fibrinolisis, pues su principal cofactor es la fibrina.

El sistema activador de plasminógeno no tiene solamente función fibrinolítica, sin que también participa en numerosos procesos fisiológicos y patológicos, especialmente en el que está mediado por uPA (Figura 2). La forma inactiva de uPA es generada por distintos tipos celulares y convertida a su forma activa por la propia plasmina, entre otros. Un componente esencial para este sistema es el receptor del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR). Este receptor se encuentra en la membrana de numerosos tipos celulares, como linfocitos T activados, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y de músculo liso, megacariocitos o células tumorales¹⁵.

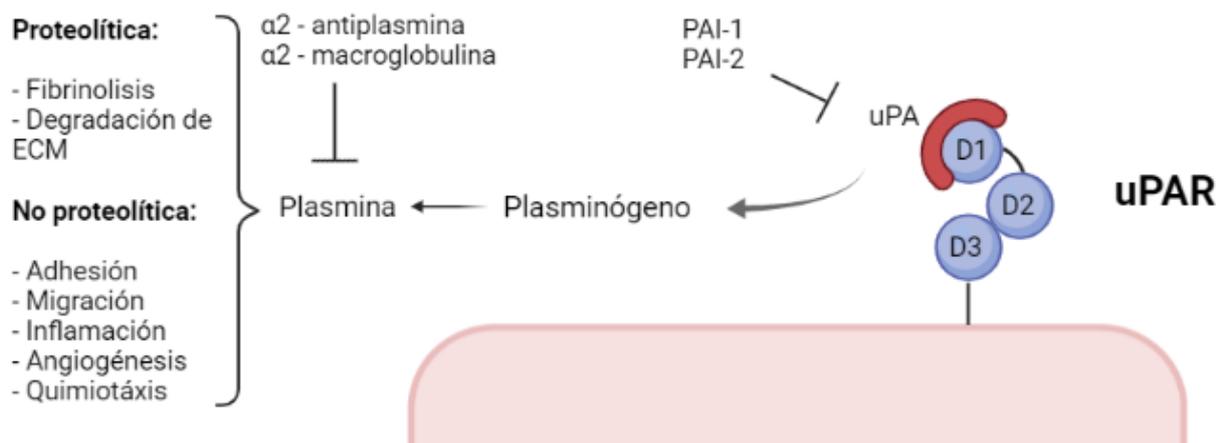


Figura 2. Sistema activador de plasminógeno mediado por uPA. Elaboración propia.

La unión de uPA a su receptor inicia una cascada proteolítica que se concentra en la superficie celular y, mediante la activación del plasminógeno a plasmina, da lugar al aclaramiento de fibrina y la remodelación de la matriz extracelular.

También ha sido descrita la implicación del sistema uPA-uPAR en migración, adhesión y proliferación celular^{16,17}, activación de factores de crecimiento, infiltración de neutrófilos, proliferación y remodelación tisular¹⁸, polimerización de actina, quimiotaxis de monocitos, angiogénesis, embriogénesis, respuesta inflamatoria, regulación de la respuesta celular mediante la activación de vías de señalización intracelulares y se han documentado interacciones con el complemento, que participa tanto en la respuesta innata como adaptativa. En procesos patológicos, destaca su implicación en cáncer, pues su capacidad proteolítica favorece el avance de las células tumorales que lo expresan¹⁹.

BIOMARCADORES EN COVID-19

La identificación de biomarcadores séricos que permitan estratificar a los pacientes que acuden a los servicios de urgencias y optimizar los recursos sanitarios, así como la asociación entre los distintos biomarcadores sanguíneos y la evolución de la enfermedad en pacientes afectados por COVID-19 ha sido un objetivo perseguido por los Servicios de Laboratorio durante esta pandemia.

Numerosos estudios han evaluado diferentes biomarcadores específicos asociados a un mal pronóstico de COVID-19. Entre ellos, destacan una disminución de los recuentos de linfocitos y plaquetas, y un aumento de ferritina, PCR, CK, PCT, LDH, ALT, AST y creatinina^{20,21}.

También se ha estudiado que varios parámetros relacionados con la hemostasia primaria, coagulación y fibrinólisis se encuentran alterados en algunos pacientes, y se ha relacionado con mayor gravedad de la infección. Por ejemplo, en un estudio de Tang *et al.*²², en el que se analizaron los parámetros de coagulación de 183 pacientes con COVID-19 durante 14 días, obtuvieron que los no supervivientes presentaban valores más altos de dímero D y FDP (productos de degradación del plasminógeno), así como mayor tiempo de protrombina en la admisión, y menor fibrinógeno y antitrombina en etapas avanzadas de la hospitalización.

- **Reactantes de fase aguda**

Los reactantes de fase aguda son marcadores de inflamación que muestran cambios significativos en suero y plasma durante numerosas condiciones, como la infección, inflamación, cirugía, traumas, quemaduras o cáncer²³. Pueden ser positivos o negativos, según aumenten o disminuyan durante la inflamación:

Entre los reactantes de fase aguda positivos mejor caracterizados se encuentran la procalcitonina, proteína C reactiva (PCR), ferritina, LDH, fibrinógeno, hepcidina y amiloide A sérico, haptoglobina, angiotensinógeno, alfa-1-antitripsina y vitronectina.

Por otra parte, los principales reactantes de fase aguda negativos son la albúmina, prealbúmina, transferrina, proteína de unión a retinol y antitrombina.

Uno de los reactantes de fase aguda positivos más sensibles es la PCR, que mide de forma directa la actividad inflamatoria. Sus niveles empiezan a incrementarse a partir de las 4-6 horas desde el daño, alcanzando su máximo a las 24-48h. Ayuda a promover la fagocitosis y la respuesta inmune innata, y activa el complemento. Se usa como marcador de infección activa y sus niveles se han correlacionado previamente con virus que afectan al tracto respiratorio, al igual que ocurre con otros reactantes de fase aguda²⁴.

Por su parte, la ferritina, una proteína que almacena hierro en forma biodisponible, aumenta durante diferentes procesos inflamatorios, aunque su función ambivalente, como inductora la expresión de moléculas proinflamatorias y como inmunomoduladora, hace que su papel en la inflamación no esté claro.

La LDH se encuentra en las células de la mayoría de los tejidos, y se libera al torrente sanguíneo ante daño tisular; es uno de los biomarcadores que se encuentra habitualmente elevado al ingreso de pacientes COVID-19.

En el caso de la albúmina, los niveles bajos se han asociado a una mayor severidad en la infección pulmonar por COVID-19.

- **Receptor soluble del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (suPAR)**

Durante las últimas décadas, el uso de este biomarcador se ha incrementado en el pronóstico de la gravedad y mortalidad en diversas patologías.

- **Estructura**

El receptor soluble del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (suPAR) fue descrito por primera vez en 1991 por Ploug *et al.*²⁵. Se trata de la forma soluble de uPAR (receptor del activador de plasminógeno tipo uroquinasa), una glicoproteína codificada por el gen PLAU (OMIM 173391), situado en el cromosoma 19. Está compuesta por 283 residuos de aminoácidos y anclada a la membrana celular mediante un anclaje carboxil-terminal glicofosfatidilinositol (GPI). Consta de tres dominios tipo Lys 6/uPAR/ alfa-neurotoxina (LU) denominados comúnmente D1, D2 y D3 de alrededor de 90 aminoácidos cada uno, siendo el D3 el que se une al anclaje GPI^{17,26} (Figura 3).

Los tres dominios se unen entre sí por secuencias flexibles, y el estudio estructural de la proteína ha revelado que la región entre D1 y D2 es más flexible que la región entre D2 y D3¹⁷, siendo una diana proteolítica de varias proteasas como el propio ligando uPA, la plasmina, la quimiotripsina, la elastasa y varias metaloproteasas.

El principal sitio de unión de uPA se encuentra en el D1, sin embargo, hay sitios de unión secundarios en el resto de los dominios, que indican que se necesita la proteína completa para una unión de alta afinidad²⁷.

uPA se une al receptor a través de su fragmento amino-terminal tipo factor de crecimiento ATF. En la región de unión uPA-uPAR se forma una cavidad con interacciones

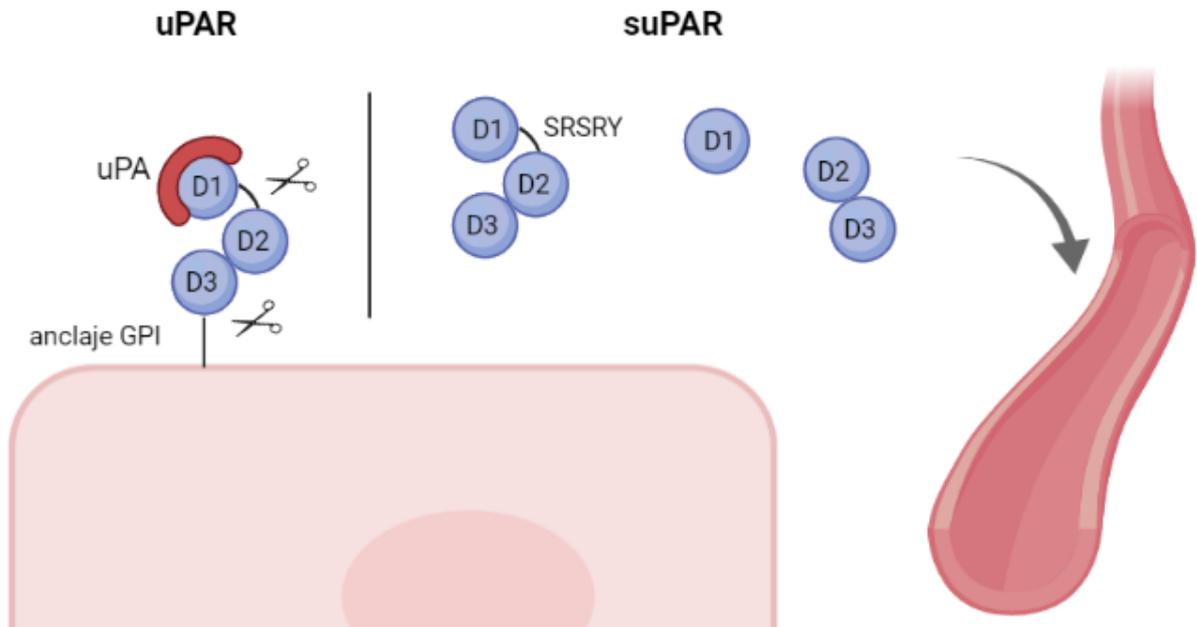


Figura 3. Estructura y formas de suPAR. Elaboración propia.

hidrofóbicas que favorecen su alta afinidad²⁶. uPAR y suPAR presentan diferencias estructurales, siendo la principal la falta del anclaje GPI en suPAR. Se ha demostrado que la escisión del anclaje-GPI altera la estructura de la proteína y la accesibilidad a la región de unión entre D1 y D2D3 se encuentra alterada en el soluble. Al igual que uPAR, suPAR es diana de varias proteasas, dando lugar a diferentes formas de este receptor¹⁵.

1. suPAR (D1-D3)

Es el receptor completo sin el anclaje GPI, resultado del receptor uPAR que ha sido escindido de la membrana. Se ha comprobado que mantiene su capacidad de unir uPA. Sin embargo, aunque mantiene la misma estructura que uPAR, en el caso del receptor soluble, uPA no realiza proteólisis en la región de unión entre D1 y D2D3. Esto sugiere la función *scavenger* de suPAR.

2. suPAR (D2D3)

Es el receptor sin el dominio de unión a uPA. Por tanto, no puede unirse con alta afinidad y su función no es la misma que la del receptor completo soluble. Se cree que la región SRSRY que queda expuesta tras ser escindido el receptor, tiene acción quimiotáctica y promueve rutas de señalización intracelular.

3. suPAR (D1)

Es el resultado de la escisión de la proteína, y no parece tener una función clara. A pesar de ser el dominio de unión a uPA, por sí solo tiene una muy baja afinidad, sugiriendo su acción inefectiva como *scavenger*¹⁵.

- Importancia clínica

suPAR ha sido detectado en sangre, plasma, suero, orina y fluido cerebroespinal, líquido ascítico y pleural. Aunque su relación con la inflamación está ampliamente documentada, aún no se conoce del todo la verdadera función biológica de este receptor. Como se ha mencionado anteriormente, algunos estudios sugieren que suPAR (D1-D3) puede actuar

inhibiendo uPAR/uPA mediante su competición por el ligando, y que suPAR (D2D3), al escindirse, tiene función quimiotáctica y por tanto participa en la respuesta inmune. También se han descrito su posible implicación en migración celular, proliferación, supervivencia, progresión tumoral¹⁵.

Los niveles de suPAR en sangre son estables, sin variaciones diurnas o tras la ingesta, y se ha correlacionado positivamente con otros biomarcadores proinflamatorios como el factor alfa de necrosis tumoral, la PCR o el recuento de leucocitos²⁸. Sin embargo, aumenta y disminuye más lentamente que otros biomarcadores, como la PCR. En la población general, los niveles plasmáticos de suPAR en individuos sanos son de 2-3 ng/ml, de 3-4 ng/ml en los servicios de urgencias y 9-10 ng/ml en pacientes críticos. Estos niveles se incrementan con la edad y están relacionados con los hábitos de vida y factores de riesgo, como el cardiovascular. La mala alimentación o el sedentarismo pueden aumentar sus valores, aunque el factor que más influye es el tabaquismo.

Niveles altos de suPAR se han asociado a una activación del sistema inflamatorio e inmune y se asocian a un peor pronóstico. Se ha empleado para identificar grupos de riesgo, siendo un biomarcador inespecífico, útil tanto para predecir la aparición de enfermedad como el curso de ésta, su gravedad y riesgo de fallecimiento. Aunque tiene un pobre valor diagnóstico, ha demostrado ser de gran utilidad pronóstica en diversas patologías, como el cáncer o enfermedad cardiovasculares^{28,29}.

- Uso en COVID-19

Varios estudios han mostrado que suPAR es un biomarcador pronóstico muy prometedor para predecir los casos graves de COVID-19 que pueden evolucionar a SDRA y fallo multiorgánico, y que puede ser empleado para estratificar a los pacientes en grupos de riesgo.

Se ha demostrado que los niveles de suPAR al ingreso sirven como un indicador temprano del riesgo de desarrollar fallo respiratorio.

Aún es mucha la información que queda por conocer sobre suPAR y su mecanismo de acción, pero sin duda se trata de un biomarcador pronóstico prometedor para predecir el curso de la enfermedad COVID-19 y otras patologías.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [internet] Washington, DC: WHO; 2021 [citado 18 oct. 2021]. Disponible en <https://covid19.who.int/>.
2. D'Alonzo D, De Fenza M, Pavone V. COVID-19 and pneumonia: a role for the uPA/uPAR system. *Drug Discov Today*. 2020;25(8):1528-34.
3. Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A, Biglari S, Parsamanesh N, Esmailzadeh A. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *J Gene Med*. 2021;23(2):e3303.
4. Miesbach W, Makris M. COVID-19: Coagulopathy, Risk of Thrombosis, and the Rationale for Anticoagulation. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2020;26:1076029620938149.
5. Taleghani N, Taghipour F. Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art. *Biosens Bioelectron*. 2021;174:112830.
6. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein [published correction appears in *Cell*. 2020;183(6):1735]. *Cell*. 2020;181(2):281-92.e6.
7. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. 2020;75(7):1564-81.
8. De León Delgado J, Pareja Cruz A, Aguilar Ramirez P, Enríquez Valencia Y, Quiroz Carrilo E, Valencia Ayala EI. SARS-CoV-2 y sistema inmune: una batalla de titanes. *Horiz. Med*. 2020; 20(2):e1209.
9. Lozada-Requena I, Núñez Ponce C. COVID-19: respuesta inmune y perspectivas terapéuticas. *Rev Per Med Exp Salud Publica*. 2020;37(2):312-9.
10. Perico L, Benigni A, Casiraghi F, Ng LFP, Renia L, Remuzzi G. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat Rev Nephrol*. 2021;17(1):46-64.
11. Tufan A, Avanoğlu Güler A, Matucci-Cerinic M. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. *Turk J Med Sci*. 2020;50(SI-1):620-32.
12. Scialo F, Daniele A, Amato F, Pastore L, Matera MG, Cazzola M, et al. ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. *Lung*. 2020;198(6):867-77.
13. Steadman E, Fandaros M, Yin W. SARS-CoV-2 and Plasma Hypercoagulability. *Cell Mol Bioeng*. 2021;14(5):1-10.
14. Haitao T, Vermunt JV, Abeykoon J, Ghamrawi R, Gunaratne M, Jayachandran M, et al. COVID-19 and Sex Differences: Mechanisms and Biomarkers. *Mayo Clin Proc*. 2020;95(10):2189-203.
15. Thunø M, Macho B, Eugen-Olsen J. suPAR: the molecular crystal ball. *Dis Markers*. 2009;27(3):157-72.
16. Li WY, Chong SS, Huang EY, Tuan TL. Plasminogen activator/plasmin system: a major player in wound healing? *Wound Repair Regen*. 2003;11(4):239-47.
17. Xu X, Gårdsvoll H, Yuan C, Lin L, Ploug M, Huang M. Crystal structure of the urokinase receptor in a ligand-free form. *J Mol Biol*. 2012;416(5):629-41.
18. Huai Q, Mazar AP, Kuo A, Parry GC, Shaw DE, Callahan J, et al. Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor. *Science*. 2006;311(5761):656-9.
19. Mahmood N, Mihalciou C, Rabbani SA. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Oncol*. 2018;8:24.
20. Malik P, Patel U, Mehta D, Patel N, Kelkar R, Akrmah M, et al. Biomarkers and outcomes of COVID-19 hospitalisations: systematic review and meta-analysis. *BMJ Evid Based Med*. 2021;26(3):107-8.
21. Alsharif W, Qurashi A. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. *Radiography (Lond)*. 2021;27(2):682-7.
22. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(4):844-7.
23. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;340(6):448-54.
24. Pérez L. Acute phase protein response to viral infection and vaccination. *Arch Biochem Biophys*. 2019;671:196-202.
25. Ploug M, Eriksen J, Plesner T, Hansen NE, Danø K, et al. A soluble form of the glycolipid-anchored receptor for urokinase-type plasminogen activator is secreted from peripheral blood leukocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Eur J Biochem*. 1992;208(2):397-404.
26. Huai Q, Mazar AP, Kuo A, Parry GC, Shaw DE, Callahan J, et al. Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor. *Science*. 2006;311(5761):656-9.
27. Montuori N, Visconte V, Rossi G, Ragno P. Soluble and cleaved forms of the urokinase-receptor: degradation products or active molecules? *Thromb Haemost*. 2005;93(2):192-8.
28. Eugen-Olsen J, Andersen O, Linneberg A, Ladelund S, Hansen TW, Langkilde A, et al. Circulating soluble urokinase plasminogen activator receptor predicts cancer, cardiovascular disease, diabetes and mortality in the general population. *J Intern Med*. 2010;268(3):296-308.
29. Sorio C, Mafficini A, Furlan F, Barbi S, Bonora A, Brocco G, et al. Elevated urinary levels of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) in pancreatic ductal adenocarcinoma identify a clinically high-risk group. *BMC Cancer*. 2011;11:448.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Callejón Martín G, Caballero Villarraso J, Bobillo Lobato J, Díaz Portillo J. Contribuciones analíticas para el

- estudio de pacientes con infección COVID-19 [Monografía en internet]. Sevilla: SANAC; 2020 [citado el 13 de noviembre de 2021]. Disponible en: https://www.sanac.org/images/site/covid2019/2020_Callejon_y_cols_Contribuciones_analiticas.pdf
- Draxler DF, Sashindranath M, Medcalf RL. Plasmin: A Modulator of Immune Function. *Semin Thromb Hemost.* 2017;43(2):143-53.
 - Duboscq C. Plasminogen/plasmin system. *Hematología.* 2017;21:48-55.
 - Gulhar R, Ashraf MA, Jialal I. Physiology, Acute Phase Reactants [internet]. Treasure Island, FL: StatPearls; 2021 [citado el 13 de noviembre de 2021]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519570/>
 - Hartmann Rasmuyssen LJ, Sandø A, Huneck Haupt T. Virogates. suPAR monograph versión 3 [internet] 2021. Disponible en https://www.virogates.com/wp-content/uploads/2021/06/suPAR-monograph-2021_V3.pdf
 - Jose RJ, Manuel A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. *Lancet Respir Med.* 2020;8(6):e46-e47.
 - Liu M, Lin L, Høyer-Hansen G, Ploug M, Li H, Jiang L, et al. Crystal structure of the unoccupied murine urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) reveals a tightly packed DII-DIII unit. *FEBS Lett.* 2019;593(11):1236-47.
 - Mahmood N, Mihalcioiu C, Rabbani SA. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Oncol.* 2018;8:24.

NUEVOS MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Autores: Irene González Martínez; Cecilia Cueto-Felgueroso Ojeda

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

Palabras clave: Riesgo cardiovascular, Aterosclerosis, Factores de riesgo emergentes

INTRODUCCIÓN

La enfermedad cardiovascular (ECV) se define como el conjunto de desórdenes del corazón y los vasos sanguíneos, entre las que se encuentran:

- La cardiopatía coronaria: enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardiaco.
- Las enfermedades cerebrovasculares: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro.
- Las arteriopatías periféricas: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores.

La ECV supone un problema de salud pública a nivel mundial pues, a pesar de la gran cantidad de recursos diagnósticos y terapéuticos que consume, continúa siendo la primera causa de mortalidad en todo el mundo.

La mayoría de las ECV pueden prevenirse actuando sobre factores de riesgo. Sin embargo, el 80% de las muertes producidas por esta enfermedad tienen lugar en países con ingresos medios y bajos principalmente porque no pueden beneficiarse de los programas de prevención.

• Aterosclerosis

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico que se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima y media de las arterias con pérdida de elasticidad. Su lesión básica es la placa de ateroma. Se trata de una patología que comienza a edades tempranas, aunque su manifestación clínica suele darse a edades avanzadas en forma de episodios cardiovasculares agudos. Esta patología se complica mediante la fisura, erosión o rotura de la placa de ateroma y la formación de un trombo en su superficie. La aterosclerosis es la causa subyacente más frecuente de ECV.

El proceso de formación de placas de ateroma o proceso aterogénico requiere que en el organismo coexistan dos fenómenos independientes, que más adelante confluirán: el depósito de lípidos y un estado proinflamatorio (Figura 1).

- Por un lado, elevadas concentraciones de lipoproteínas LDL circulantes, cargadas de colesterol, se depositan en el endotelio y lo atraviesan hasta llegar a la capa íntima arterial.
- Por otro lado, factores que inducen la inflamación favorecen que los monocitos sanguíneos sean atraídos por quimiocinas y atraviesen el endotelio mediante diapédesis.

Una vez dentro, tanto las LDL como las células, sufren modificaciones.

Las lipoproteínas se oxidan, dando lugar a la aparición de LDL oxidadas, partículas pequeñas y densas que tienden a agregarse y poseen propiedades proinflamatorias. Las LDL oxidadas favorecen la diferenciación de monocitos hacia macrófagos.

Los macrófagos captan LDL modificadas y se transforman en células espumosas que se van acumulando y liberan citoquinas y metaloproteasas, que degradan la pared arterial.

Las células musculares lisas (CML) de la capa media arterial, activadas por citocinas y factores de crecimiento liberados en las lesiones, se transforman a un fenotipo sintético, migran a la íntima (atraídas por las citoquinas liberadas por las células espumosas) y proliferan contribuyendo a la evolución de las lesiones.

A medida que la inflamación empeora y la capacidad de las células fagocíticas para eliminar los desechos apoptóticos y necróticos se ve comprometida, se forma un núcleo necrótico. Conforme va aumentando la inflamación dentro de la placa, aumenta el riesgo de que se produzcan eventos cardiovasculares secundarios al debilitamiento y pérdida de integridad de la estructura de la misma. Esto aumenta la probabilidad de ruptura repentina de la placa con la formación subsiguiente de trombo, obstrucción de la luz arterial y aparición de eventos cardiovasculares.

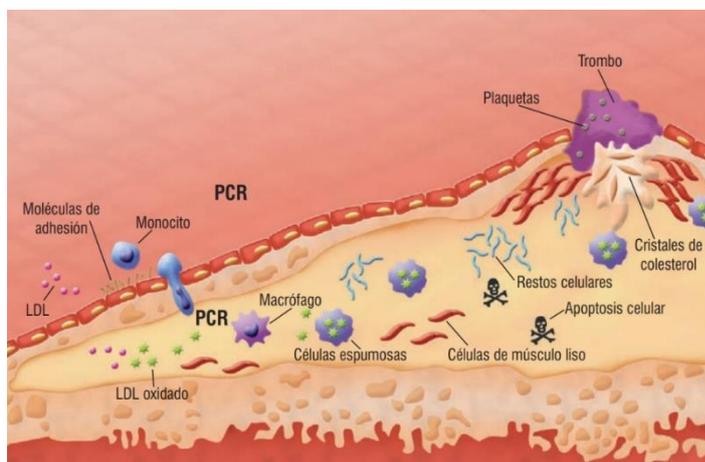


Figura 1. Esquema del proceso aterosclerótico. Adaptado de Domínguez-Amoroch O, 2008.

• Riesgo cardiovascular

El riesgo cardiovascular (RCV) es la probabilidad que tiene un individuo de sufrir una enfermedad cardiovascular dentro de un determinado plazo de tiempo. Debido a que gran parte de los eventos cardiovasculares son prevenibles, el cálculo del RCV es la mejor estrategia actual para el abordaje de dichas enfermedades. Para ello, se realiza un cálculo basado en ecuaciones que puntúan los diferentes factores de riesgo,

con el objetivo principal de clasificar a los pacientes según el riesgo y realizar seguimiento de los mismos. Actualmente, el cálculo inicial del RCV se realiza utilizando las tablas de RCV que se basan en los factores de riesgo clásicos que se estructuran en modificables y no modificables y son ampliamente conocidos (Tabla 1).

Factores de Riesgo Mayores	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Edad <ul style="list-style-type: none"> · Hombres ≥ 45 años · Mujeres ≥ 55 años ▪ Sexo masculino y mujer postmenopausia ▪ Antecedente personal de ECV ▪ Antecedente de ECV prematura en familiar 1 grado <ul style="list-style-type: none"> · Hombres < 55 años · Mujeres < 65 años 	No modificables
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hipertensión arterial ▪ Diabetes ▪ Dislipemia (c-LDL alto y/o c-HDL bajo) ▪ Tabaquismo ▪ ERC etapa 3b-5 y/o albuminuria moderada/severa persistente 	
Factores de Riesgo Condicionantes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Obesidad (IMC ≥ 30Kg/m²) ▪ Obesidad abdominal (CC ≥ 90cm en hombres y ≥ 80cm en mujeres) ▪ Triglicéridos ≥ 150 mg/dL ▪ Sedentarismo 	

Tabla 1. Factores de RCV clásicos estructurados en modificables y no modificables. Elaboración propia.

Sin embargo, con los factores de riesgo clásicos sigue sin detectarse precozmente a una parte de la población que desarrolla finalmente ECV prematura. La necesidad de mejorar la precisión de los modelos convencionales de predicción del riesgo es particularmente importante entre los pacientes con riesgo intermedio. Este grupo, a menudo está formado por personas con riesgo cardiovascular identificado de manera imprecisa, para quienes las decisiones de tratamiento suelen ser inciertas. Debido a esto, en los últimos años, se han dedicado importantes esfuerzos para encontrar nuevas magnitudes bioquímicas con mayor capacidad predictiva y mejorar la prevención de la ECV. Son los llamados factores de riesgo emergentes (Tabla 2).

El valor añadido de estas magnitudes reside en la modificación de la clasificación del riesgo cardiovascular, de modo que, si la concentración de dos de estas magnitudes bioquímicas es superior al valor discriminante, se considera que el nivel de riesgo estimado debe aumentarse una categoría sobre el obtenido con los factores de riesgo convencionales.

FACTORES DE RIESGO EMERGENTES	
FR emergentes consolidados	Nuevos FR emergentes
Lipoproteína (a)	Lp-PLA2
Homocisteína	Cistatina C
PCR-hs	HDL disfuncional
Factores genéticos	PTX3
Calcium-Score	

Tabla 2. Factores de riesgo emergentes. Adaptado de: Gómez JA, 2010.

PCR ULTRASENSIBLE (PCR-hs)

La proteína C reactiva (PCR) es una proteína que se sintetiza en los hepatocitos en respuesta al estímulo de la interleukina 6 (IL-6) favorecido por la interleukina 1 (IL-1). Está formada por cinco subunidades idénticas no glicosiladas y unidas por enlaces no covalentes. La PCR forma parte de la subfamilia de pentraxinas cortas y es un miembro característico de las proteínas de "fase aguda", cuya síntesis aumenta en los procesos inflamatorios. Ante un daño o agresión tisular su concentración se eleva rápidamente (a veces hasta 100 veces su concentración normal) alcanzando un pico máximo a las 24-48 horas y posteriormente se mantiene o decrece según la evolución clínica del paciente.

Las formas biológicamente activas de la PCR son: la estructura pentamérica (p-PCR) o nativa y la isoforma monomérica, formada como resultado de un proceso de disociación de la p-PCR.

En los Servicios de Urgencias, la PCR se utiliza para diferenciar respuesta inflamatoria sistémica, sepsis o shock séptico. Los intervalos de referencia establecidos son:

- Sujetos sanos: <5 mg/L
- Inflamaciones leves o infecciones virales: 10-50 mg/L
- Inflamaciones agudas o infecciones bacterianas: 50-200 mg/L

Sin embargo, además de su papel como reactante de fase aguda, se ha demostrado que la PCR es un potente predictor de ECV dada su implicación en el proceso aterosclerótico.

• Funciones biológicas

Para entender cómo influye la PCR en el proceso aterosclerótico, hay que conocer sus funciones biológicas, que son:

- **Activación del complemento:** participa en la activación y el daño tisular mediado por el complemento. Tiene afinidad de unión por residuos de fosfatidilcolina y al unirse a estos ligandos, activa el complemento por la vía clásica.
- **Actividad fagocítica:** debido a sus características de unión al ligando forma parte de la inmunidad natural funcionando como opsonina en el proceso de fagocitosis.
- **Expresión de moléculas de adhesión:** eVCAM-1, ICAM-1 y de selectina-E.

- **Aumenta la secreción de la proteína quimioattractante del monocito-1 (MCP-1).**

• **PCR y aterosclerosis**

El papel de la PCR en el inicio y progresión de la aterosclerosis todavía no se ha esclarecido con detalle. Se ha demostrado que participa directa e indirectamente en numerosas acciones proaterogénicas en el subendotelio vascular, contribuyendo directamente a la generación de un endotelio disfuncional y al reclutamiento de macrófagos y de otros leucocitos en la capa íntima arterial. Todo ello ocurre gracias a una serie de mecanismos relacionado con sus funciones biológicas (Figura 2). Cuando la PCR se une al LDL oxidado (éste que presenta residuos de fosfatidilcolina) se produce la activación del complemento y favorece su fagocitosis dando lugar a células espumosas. Además, produce una disminución significativa de la producción de óxido nítrico mediante la reducción de la estabilidad de la enzima óxido nítrico sintetasa, una enzima crítica para la integridad de las células endoteliales. Por otro lado, genera una sobreexpresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y de VCAM-1 manteniendo un ambiente proinflamatorio. Finalmente, la sobreexpresión de MCP-1 promueve la quimiotaxis y la adherencia del monocito a la célula endotelial y la liberación de especies reactivas de oxígeno.

De todo ello podemos afirmar, que la PCR no puede considerarse *a priori* como una causa directa de aterogénesis, sino más bien como un biomarcador de una situación fisiopatológica que además es favorable al desarrollo de la misma.

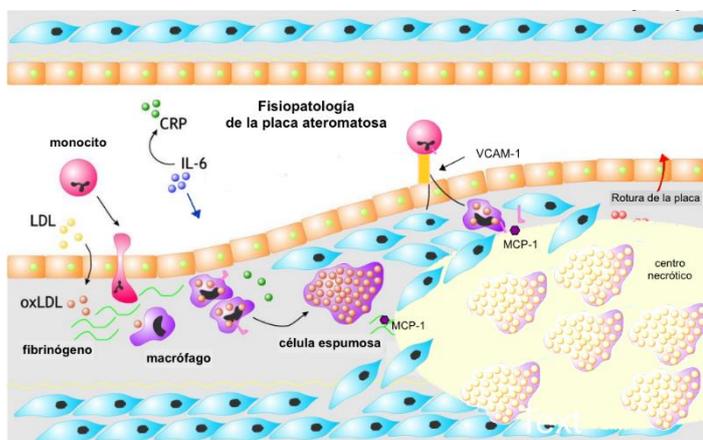


Figura 2. Esquema de la participación de la PCR en la aparición de un endotelio disfuncional y al reclutamiento de macrófagos. Adaptado de: González Hernández A, 2014.

• **Consideraciones para la medida de PCR-hs**

Para establecer una estratificación adecuada del riesgo cardiovascular a partir de los niveles de PCR, es necesario poder medir cambios significativos a concentraciones de entre 0,5 y 3,5 mg/L, y los métodos convencionales no disponen de la suficiente sensibilidad analítica para ello.

A partir de esta necesidad, surgen métodos ultrasensibles (PCR-hs) que si cumplen con la sensibilidad descrita.

Los valores discriminantes y su interpretación para la concentración de PCR-hs, de los que se dispone actualmente están recogidos en la Tabla 3.

Concentración PCR-hs	Interpretación
<1 mg/L	Riesgo Cardiovascular Bajo
1-3 mg/L	Riesgo Cardiovascular Medio
>3 mg/L	Riesgo Cardiovascular Alto

Tabla 3. Valores discriminantes y su interpretación para la concentración de PCR-hs. Adaptado de: Domínguez-Amorocho O, 2008.

Si la concentración de PCR-hs está comprendida entre 3 y 10 mg/L, debe considerarse aumentar la categoría de RCV obtenida con los factores de riesgo cardiovascular tradicionales. Sin embargo, si el resultado fuese superior a 10 mg/L, debe descartarse la existencia de un proceso inflamatorio sistémico que no permita evaluar el proceso inflamatorio cardiovascular.

Para la interpretación del resultado de la medida de PCR-hs hay que tener en cuenta algunos factores: la concentración de PCR-hs puede aumentar si se realiza ejercicio muy intenso, en fumadores con elevado consumo de cigarrillos y su elevación se ha relacionado con un índice de masa corporal alto. Por otro lado, el consumo moderado de alcohol está asociado a concentraciones más bajas de PCR-hs y la administración de estatinas disminuye las concentraciones en suero entre un 15-20%.

• **Utilidad de la PCR-hs**

Existe evidencia de que la concentración aumentada de PCR-hs es un factor de riesgo cardiovascular independiente de los factores tradicionales y se ha demostrado que tiene un poder predictivo de futuros eventos cardiovasculares más potente que la concentración en suero de colesterol LDL. Los estudios de Danesh J. *et al*¹ y Ridker PM. *et al*² muestran que la PCR-hs puede predecir riesgo cardiovascular elevado en pacientes con concentraciones de colesterol LDL inferiores al valor discriminante para el desarrollo de un primer evento cardiovascular.

El valor añadido de esta magnitud reside en la modificación de la clasificación del RCV. La última guía del *National Cholesterol Education Program (NCEP)*³ considera que, para los individuos que no estén en ninguno de los 4 grupos de tratamiento con estatinas, pero sobre los que se tengan dudas de iniciar un tratamiento hipolipemiante, es necesario considerar otros factores de riesgo no tradicionales de cara a decidir comenzar un tratamiento con estatinas. Uno de ellos, es la concentración de PCR-hs. En este caso, si la concentración es superior a 2 mg/L, puede considerarse suficiente como para tomar una decisión de tratamiento.

A pesar de la evidencia científica de la utilidad de la medida de la concentración de PCR-hs para la evaluación del riesgo cardiovascular, no existen recomendaciones unánimes de sociedades internacionales para su determinación en prevención primaria, debido posiblemente a la falta de estandarización de los procedimientos de medida, así como a su elevada variabilidad intra e interindividual. También hay que mencionar algunos puntos débiles, como la multiplicidad

de factores de confusión, la falta de especificidad, falta de estrategias terapéuticas específicas y elevado coste de su medida respecto a los factores de riesgo tradicionales.

- **Recomendaciones generales**

No se recomienda realizar la medición de la concentración de PCR-hs como método de cribado para la identificación del riesgo cardiovascular en la población general sino para la evaluación del riesgo cardiovascular en los casos de prevención secundaria, riesgo cardiovascular intermedio y alto, así como en atención primaria sólo si existen dudas sobre el inicio de tratamiento hipolipemiente.

Cuando la concentración de PCR-hs sea superior a 3 mg/L e inferior a 10 mg/L se recomienda: repetir la medida de la concentración de PCR-hs a las dos semanas, intensificar el control sobre los factores de riesgo modificables de ECV, valorar la iniciación o la intensificación de un tratamiento para disminuir la concentración de colesterol de LDL y aumentar la categoría de riesgo cardiovascular estimado con los factores de riesgo tradicionales.

FOSFOLIPASA A2 ASOCIADA A LIPOPROTEÍNA

Otro marcador emergente de RCV es la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína (Lp-PLA2). Se trata de un biomarcador específico de inflamación vascular sintetizado por los macrófagos que realiza su función biológica en la íntima arterial y proporciona información sobre la inflamación y estabilidad de la placa aterosclerótica. Los niveles elevados de Lp-PLA2 en suero son indicativos de placas propensas a la rotura ya que esta enzima se localiza en mayor concentración en aquellas placas con núcleo necrótico y no se encuentra en las placas en su estado inicial. Es un fuerte predictor independiente de riesgo cardiovascular.

- **Lp-PLA2 y aterosclerosis**

En cuanto a la relación de Lp-PLA2 con el proceso de aterosclerosis, la Lp-PLA2 hidroliza fosfolípidos en partículas de LDL oxidadas en el espacio subendotelial.

Concretamente, hidroliza el enlace éster central (sn-2) de los fosfolípidos, lo que produce ácidos grasos oxidados y lisofosfatidilcolina (lysoPC), una molécula con una variedad de efectos potencialmente aterogénicos, incluida la quimioatracción de monocitos, aumento de la expresión de moléculas de adhesión e inhibición de producción de óxido nítrico endotelial. De esta manera, se produce un aumento del reclutamiento de monocitos a la íntima, donde se diferencian para convertirse en macrófagos y, finalmente, en células espumosas, mientras que al mismo tiempo producen más Lp-PLA2 de forma local dando lugar a un círculo vicioso (Figura 3).

- **Consideraciones para la medida de Lp-PLA2**

No se recomienda medir Lp-PLA2 en pacientes con bajo riesgo de enfermedad cardiovascular (un factor de riesgo o menos).

Los pacientes con dos o más factores de riesgo (puntuación de riesgo de Framingham a 10 años: 10-20%) son candidatos óptimos para la detección de este parámetro.

El punto de corte consenso de Lp-PLA2 para la reasignación del riesgo cardiovascular es 200 ng/mL.

- Si el nivel sérico de esta enzima es inferior a 200 ng/mL, el nivel de riesgo del paciente no requiere ningún ajuste adicional.
- Si el nivel sérico de Lp-PLA2 es superior a 200 ng/mL, el paciente debe ser reasignado a un estadio de alto riesgo. En el caso de pacientes clasificados como de alto riesgo, los objetivos de concentración de colesterol-LDL y colesterol no HDL son inferiores a 100 mg/dL y 130 mg/dL respectivamente.

Entre los pacientes de alto riesgo (cardiopatía coronaria establecida, diabetes mellitus, aneurisma de la aorta abdominal, enfermedad vascular periférica, enfermedad de la arteria carótida sintomática o una puntuación de riesgo de Framingham a 10 años > 20%), se puede considerar la posibilidad de matizar aún más la estimación del riesgo con

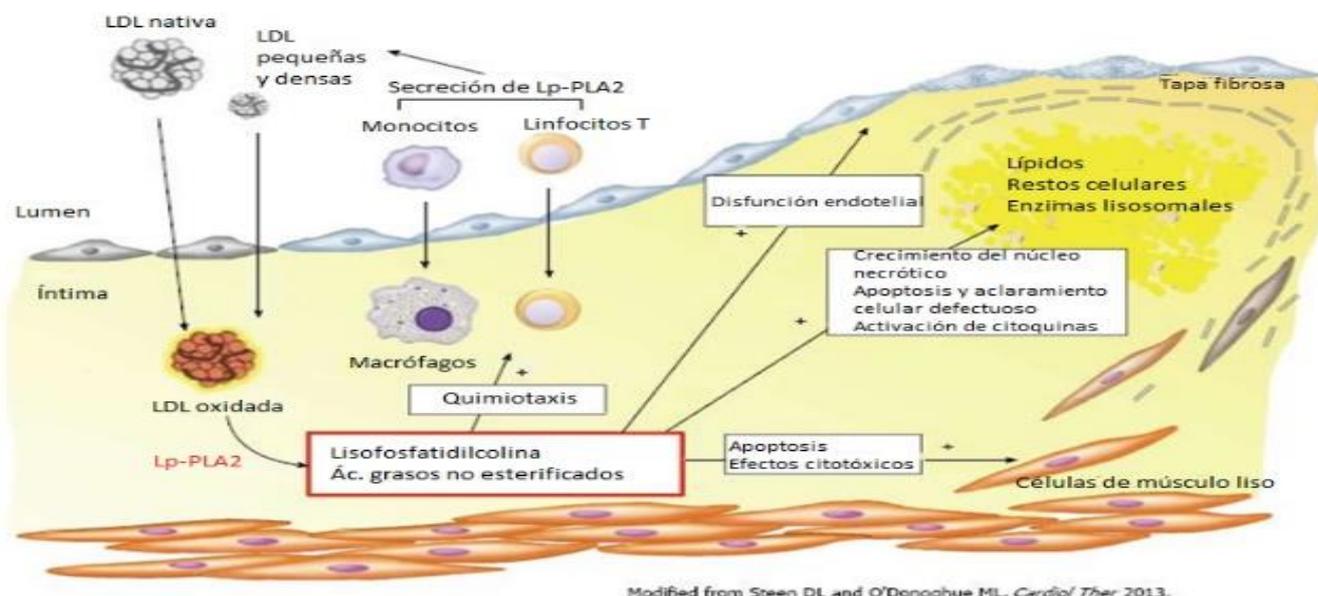


Figura 3. Esquema de la participación de Lp-PLA2 en el proceso aterosclerótico. Adaptado de: Steen DL y O'Donoghue ML, 2013.

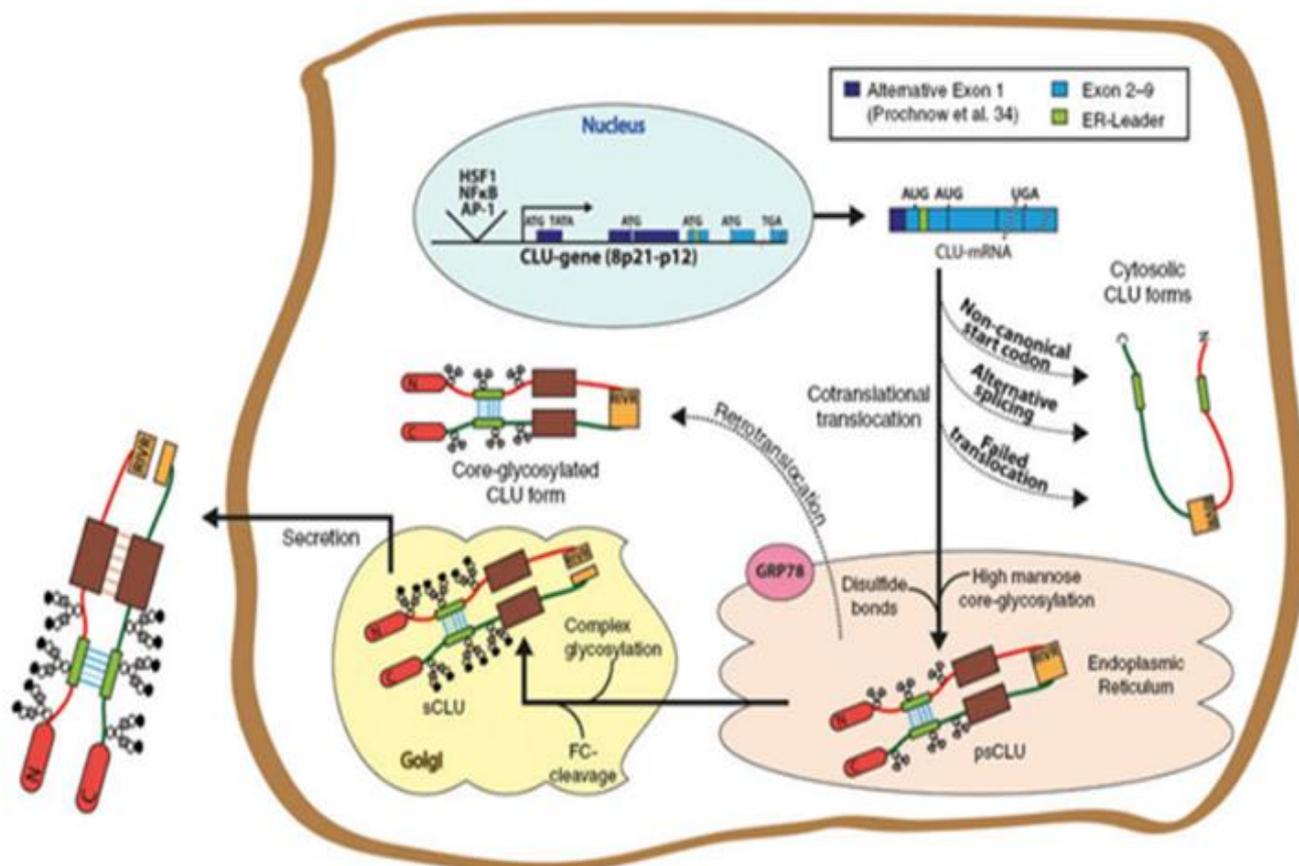


Figura 4. Esquema de expresión de la forma secretada de Apo J. Adaptado de: Rohne P, 2015.

la medida de Lp-PLA2. Si su determinación en el suero del paciente es superior a 200 ng/mL, entonces el paciente puede ser reclasificado como de muy alto riesgo. En el caso de pacientes clasificados como de muy alto riesgo, los objetivos de concentración de colesterol-LDL y colesterol no HDL son inferiores a 70 mg/dL y 100 mg/dL respectivamente.

- **Utilidad de Lp-PLA2**

Como ya se ha comentado, Lp-PLA2 es un marcador específico de inflamación vascular y refleja la presencia de placas propensas a romperse. En contraste con la PCR-hs, la Lp-PLA2 tiene alta especificidad y baja variabilidad biológica. Este marcador podría satisfacer la importante necesidad clínica de determinar la presencia de una placa de ateroma propensa a romperse ya que más de dos tercios de los infartos de miocardio ocurren en individuos con menos del 50% de estenosis en angiografía coronaria.

A pesar de que los estudios realizados y resultados obtenidos son prometedores, se requiere más investigación para establecer Lp-PLA2 como objetivo terapéutico. Se ha demostrado que los medicamentos tradicionales para reducir los lípidos como las estatinas, los fibratos, la niacina y el aceite de pescado omega-3 reducen significativamente las concentraciones plasmáticas de Lp-PLA2. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el que estos compuestos reducen la concentración de esta enzima, ya que, la reducción del colesterol LDL circulante al que se asocia en gran medida la Lp-PLA2, no explica completamente su disminución.

CLUSTERINA O APO J

El siguiente marcador, Apo J, no es un marcador de riesgo cardiovascular *per se*, pero está presente en el proceso aterosclerótico y tiene potencial como marcador para ayudar a frenar su avance/evolución.

Deben distinguirse dos formas de clusterina con dos funciones diferentes e incluso antagónicas. La clusterina nuclear (nCLU), es una proteína truncada de 55 kDa que se genera a partir de un proceso de splicing alternativo, ubicado en el núcleo de las células y cuya función es el control de la expresión de proteínas a través de la interacción con factores de transcripción. Por otro lado, la clusterina secretada, es un heterodímero altamente glicosilado de 80 kDa que es secretado por las células y, por lo tanto, se encuentra principalmente en los líquidos extracelulares. La expresión de la forma secretada (sCLU o Apo J) aumenta durante diversos procesos de estrés fisiológico y patológico y tiene actividad de chaperona. La clusterina nuclear está relacionada con procesos de apoptosis mientras que la secretada se relaciona con mecanismos de supervivencia.

La Apo J (clusterina secretada) es una chaperona extracelular que se une de forma no covalente a proteínas mal plegadas para prevenir la agregación de proteínas tanto amorfas como amiloides. La expresión de Apo J aumenta durante diversas situaciones fisiológicas y patológicas, ya que forma parte de un sistema de control de calidad contra el plegamiento de proteínas. Se ha relacionado con varios procesos patológicos como el cáncer, diabetes, Alzheimer, insuficiencia renal y enfermedad cardiovascular. Pero también está involucrada en mecanismos fisiológicos como

transporte de lípidos, reorganización de microtúbulos, regulación del complemento, etc.

- **Relación de APO J con las lipoproteínas**

La apolipoproteína B (Apo B) es el componente estructural principal de LDL, constituyendo más del 99% del contenido de proteína en el LDL nativo, sin embargo, hay que destacar la presencia de proteínas no Apo B en LDL.

Mientras LDL está en circulación, otras proteínas plasmáticas intercambiables se asocian temporalmente con estas partículas. Los estudios proteómicos de LDL han demostrado un número cada vez mayor de proteínas que no solo incluye apolipoproteínas y enzimas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas, sino también, proteínas relacionadas con la coagulación, inflamación, inmunidad y el sistema del complemento. Además, se ha visto como el contenido de estas proteínas minoritarias aumenta en las LDL pequeñas y densas y las LDL oxidadas. Finalmente, otras proteínas podrían aparecer como una respuesta fisiológica para prevenir modificaciones aterogénicas del LDL. Este podría ser el caso de Apo J cuyo contenido aumenta especialmente en el LDL oxidado.

- **APO J y aterosclerosis**

La mayoría de los estudios de Apo J se centraron inicialmente en las lipoproteínas HDL porque se pensaba que la Apo J solo estaba presente en esta lipoproteína.

La función de Apo J en HDL se relaciona con la estabilización de Apo A-1, paraoxonasa 1 y otras proteínas contribuyendo a mantener su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiapoptótica. Los estudios en humanos son escasos, pero algunos como el de Hoofnagle AN. *et al*⁴ han mostrado que existe una disminución del contenido de Apo J en las HDL de sujetos con alto riesgo cardiovascular, así como en pacientes con diabetes, obesidad, hiperlipemia o enfermedad de las arterias coronarias. Además, se ha demostrado que la disminución de Apo J en las HDL de pacientes con enfermedad de las arterias coronarias promueve la pérdida de su capacidad antiapoptótica.

La primera evidencia de la relación de Apo J con la aterosclerosis, fue su sobreexpresión en lesiones ateroscleróticas en comparación con arterias sanas. Los estudios proteómicos recientes que analizan el contenido proteico de LDL y VLDL han detectado la presencia de Apo J en estas lipoproteínas. Aunque el contenido de Apo J en HDL es de 10 a 20 veces mayor que en LDL o VLDL, su función cuando se une a lipoproteínas que contienen Apo B no debe subestimarse.

Considerando el papel de la Apo J en la prevención del plegamiento incorrecto y la agregación de proteínas, y teniendo en cuenta que la agregación de LDL es un evento clave que favorece la unión de las lipoproteínas a los proteoglicanos de la pared arterial en el espacio subendotelial, se puede deducir fácilmente que la Apo J podría tener un efecto directo sobre la aterogenicidad de LDL.

A su vez, los análisis proteómicos revelaron de 10 a 20 veces más de contenido de Apo J en el LDL oxidado que en el LDL

nativo. Las anomalías estructurales presentes en el LDL oxidado, incluida la agregación de partículas y el plegamiento incorrecto de Apo B, probablemente estén relacionadas con el aumento del contenido de Apo J. En el estudio de Martínez-Bujidos M. *et al*⁶ se evaluó si la asociación entre LDL oxidado y Apo J se debía simplemente a la exposición de dominios hidrofóbicos en agregados LDL o si Apo J jugaba un papel activo en la prevención de la agregación de LDL. En el estudio, del LDL total se eliminaron las partículas que contenían Apo J. Curiosamente, aunque la Apo J estaba presente en menos del 0,3% de las partículas de LDL, su agotamiento dio como resultado una mayor susceptibilidad a la agregación inducida por varios mecanismos independientes: lipólisis, proteólisis y agregación espontánea. A su vez, la adición de Apo J exógena a LDL hizo que estas partículas fueran más resistentes a la agregación.

Un aspecto que aún no se ha estudiado es la posibilidad de que la unión de Apo J a LDL agregadas podría facilitar su eliminación de la sangre o del espacio extracelular. Aunque existe cierta controversia con respecto al reconocimiento de Apo J por el receptor LRP1, se sabe que Apo J interactúa con algunos miembros de la familia de receptores de LDL, incluida la megalina (LRP2), el receptor 2 de Apo E y el receptor de VLDL.

El contenido de proteínas menores en LDL podría tener un papel más importante en el desarrollo de la aterosclerosis de lo esperado por sus bajas concentraciones. Según su función en otras enfermedades, como el Alzheimer, Apo J podría tener un efecto relevante en el control de la agregación de LDL, un paso inicial crítico en la aterogénesis. Además, también podría prevenir los efectos citotóxicos mediados por LDL modificadas en el espacio subendotelial.

Estas observaciones abren la posibilidad de desarrollar herramientas terapéuticas basadas en Apo J diseñadas para ralentizar la progresión de la aterosclerosis. En este contexto, los péptidos miméticos derivados de Apo J se han utilizado con éxito para prevenir el desarrollo de aterosclerosis en modelos animales.

CONCLUSIONES

A pesar de los programas de prevención de RCV existentes, la ECV sigue siendo un grave problema de salud a nivel mundial. Como hemos visto, con los factores de riesgo clásicos, sigue sin detectarse precozmente a una parte de la población que desarrolla finalmente ECV prematura. Debido a ello es importante seguir buscando nuevas magnitudes biológicas que ayuden a realizar una mejor predicción del riesgo.

En cuanto a los 3 biomarcadores comentados a lo largo del capítulo, podemos resumir su utilidad de la siguiente manera:

- PCR-hs: estratificación adecuada de RCV en pacientes con riesgo intermedio.
- Lp-PLA2: detección de pacientes con placa propensa a romperse.
- APO J: posible marcador protector contra el proceso aterosclerótico.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2004 Apr 1;350(14):1387-97
 2. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2002 Nov 14;347(20):1557-65
 3. Stone N, Robinson J, Lichtenstein A, et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults. National Cholesterol Education Program, 2014;129:S1–S45
 4. Hoofnagle AN, Wu M, Gosmanova AK, Becker JO, Wijsman EM, Brunzell JD, et al. Low clusterin levels in high-density lipoprotein associate with insulin resistance, obesity, and dyslipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Dec;30(12):2528-34.
 5. Martínez-Bujidos M, Rull A, González-Cura B, Pérez-Cuellar M, Montoliu-Gaya L, Villegas S, et al. Clusterin/apolipoprotein J binds to aggregated LDL in human plasma and plays a protective role against LDL aggregation. *FASEB J*. 2015 May;29(5):1688-700.
- Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017 Sep 18;19(11):42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>
 - O'Donnell CJ, Elosúa R. Factores de riesgo cardiovascular. Perspectivas derivadas del Framingham Heart Study. *Rev Esp Cardiol*. 2008;61(3):299-310.
 - Rohne P, Prochnow H, Koch-Brandt C. The CLU-files: disentanglement of a mystery. *Biomol Concepts*. 2016 Feb;7(1):1-15.
 - Rull A, Ordóñez-Llanos J, Sánchez-Quesada JL. The role of LDL-bound apoJ in the development of atherosclerosis. *Clin Lipidol*. 2015;10(4):321-8.
 - Steen DL, O'Donoghue ML. Lp-PLA2 Inhibitors for the Reduction of Cardiovascular Events. *Cardiol Ther*. 2013 Dec;2(2):125-34.
 - Toth PP, McCullough PA, Wegner MS, Colley KJ. Lipoprotein-associated phospholipase A2: role in atherosclerosis and utility as a cardiovascular biomarker. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010;8(3):425-38.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Acevedo M, Varleta P, Kramer V, Quiroga T, Prieto C, Parada J, et al. Association of lipoprotein-associated phospholipase activity A2 with cardiovascular risk factors. *Rev Med Chil*. 2013;141(11):1382–8.
- Brito V, Alcaraz A, Augustovski F, Pichón-Riviere A, García-Martí S, Bardach A, et al. Proteína C ultrasensible como factor independiente de riesgo en población con y sin antecedentes cardiovasculares. *Arch Cardiol Mex*. 2015;85(2):124–35.
- Domínguez-Amorocho O, Patiño-Cuervo D. Proteína C reactiva ultrasensible (PCRus) como marcador de riesgo de enfermedad cardiovascular. *Med Lab*. 2008;14:457-78.
- Gazi I, Lourida ES, Filippatos T, Tsimihodimos V, Elisaf M, Tselepis AD. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is a marker of small, dense LDL particles in human plasma. *Clin Chem*. 2005;51(12):2264-73.
- Geovanini GR, Libby P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clin Sci (Lond)*. 2018;132(12):1243-52.
- Gómez JA. Factores de riesgo. *Clin Invest Arterioscl*. 2010;22(Supl 2):54-57.

MONITORIZACIÓN DE FÁRMACOS

Autores: Celia Amil Manjón; Fernando Calvo Boyero

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

Palabras clave: Farmacocinética, Margen terapéutico, Estado estacionario

PRINCIPIOS GENERALES DE FARMACOCINÉTICA CLÍNICA

La farmacocinética es la ciencia que estudia la evolución de los fármacos y sus metabolitos en el organismo, así como la evolución de la respuesta farmacológica.

Dentro de esta, la farmacocinética clínica se centra en el control individualizado del tratamiento para cada paciente, destacando entre sus principales funciones la individualización de la posología y la detección de respuestas anómalas al tratamiento (por incumplimiento, problemas de biodisponibilidad, errores de medicación, interacciones, efectos farmacogenéticos, etc.).

- **Serie LADME**

Las distintas etapas que sigue el fármaco a través del organismo se conocen bajo las siglas LADME. En cada una de ellas hay distintos parámetros farmacocinéticos que las definen y que nos van a permitir predecir los niveles plasmáticos o corregir la posología.

Las primeras etapas son la liberación y la absorción, que están definidas por la biodisponibilidad (fracción de fármaco que llega de forma inalterada a la circulación sistémica).

La siguiente etapa es la distribución del fármaco por todo el organismo y especialmente hasta su lugar de acción, y viene determinada por el volumen de distribución (relación entre la cantidad de fármaco presente en el organismo y su concentración).

Finalmente se produce la eliminación del fármaco. La eliminación comprende a su vez las etapas de metabolismo y excreción que se pueden medir mediante la semivida (tiempo necesario para que la concentración de fármaco se reduzca a la mitad) y el aclaramiento. Este último es el volumen de sangre depurado de fármaco por unidad de tiempo y nos indica la capacidad del organismo para eliminar el fármaco.

- **Interacciones farmacocinéticas entre fármacos**

Hay que tener en cuenta que en cada una de estas etapas que sigue el fármaco hay muchos factores condicionantes e interacciones farmacocinéticas con otras sustancias que pueden modificarlas:

- La absorción y la biodisponibilidad pueden ser menores de lo normal por la presencia de sustancias que modifican el pH alterando la solubilidad o que compiten por los transportadores que permiten el paso a través de las membranas biológicas.
- En la distribución hay que tener en cuenta que muchos fármacos (por ejemplo antiepilépticos como el ácido valproico y la fenitoína o los AINE) presentan una elevada unión a proteínas plasmáticas como la albúmina

o la *alfa1*-glicoproteína ácida, siendo solo la fracción de fármaco libre la que ejerce los efectos terapéuticos. Esto es importante en patologías en las que disminuye la albúmina o al ser desplazados por moléculas con mayor afinidad, porque provocarán grandes aumentos en la concentración de fármaco libre y la toxicidad.

- En cuanto al metabolismo, las enzimas hepáticas del citocromo P450 se van a caracterizar por una amplia variabilidad interindividual debido a la existencia de distintos polimorfismos genéticos en su actividad y también porque presentan múltiples interacciones por fenómenos de inducción e inhibición metabólica.
- Finalmente, en la excreción pueden darse interacciones por modificaciones del pH o fenómenos de competición con los transportadores presentes en la nefrona.

El metabolismo es la etapa en la que se van a producir las interacciones farmacocinéticas más importantes:

- La inducción enzimática es un fenómeno por el cual determinadas sustancias van a estimular la síntesis de algunas enzimas hepáticas, lo que supone un aumento de la capacidad metabólica y la disminución de las concentraciones de los fármacos metabolizados por esta vía. Como consecuencia, su eficacia se reducirá y será necesario administrar mayores dosis.

Algunos ejemplos de inductores son antiepilépticos como la carbamazepina, la fenitoína y el fenobarbital; el tabaco, la ingesta crónica de alcohol, el hipérico o la rifampicina.

- Del mismo modo, otras sustancias pueden inhibir la actividad de las enzimas hepáticas (de determinados citocromos) reduciendo el metabolismo y aumentando las concentraciones de fármaco con la consiguiente posible toxicidad.

Destacan entre ellas los azoles, el zumo de pomelo, la ingesta aguda de alcohol, el valproato, la eritromicina o el omeprazol.

LA MONITORIZACIÓN DE FÁRMACOS Y SU UTILIDAD CLÍNICA

La monitorización de fármacos es un proceso que permite optimizar los tratamientos farmacológicos en los pacientes mediante el empleo de las concentraciones plasmáticas de fármacos combinadas con criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos.

Se basa en la existencia de diferencias interindividuales en las características farmacocinéticas de los fármacos y su principal objetivo es la individualización posológica,

reduciendo la toxicidad sin comprometer la eficacia o viceversa.

Hay que tener en cuenta que la monitorización de los fármacos no está siempre justificada, sino que deben darse una serie de características para que tenga utilidad clínica:

- Relación conocida entre las concentraciones plasmáticas del fármaco y la intensidad y duración de los efectos, tanto terapéuticos como tóxicos. De hecho, la monitorización estará especialmente justificada cuando haya una mala relación entre la dosis administrada y concentraciones alcanzadas y buena relación entre la concentración y la respuesta terapéutica.
- Fármacos con margen terapéutico estrecho, en los que las concentraciones tóxicas y terapéuticas se encuentran muy cercanas y es necesario ajustar muy bien la dosis para conseguir efectos terapéuticos sin producir toxicidad.
- Fármacos con amplia variabilidad interindividual en su perfil farmacocinético y en los que por tanto, las concentraciones alcanzadas con la administración de una misma dosis variarán mucho de unos pacientes a otros.
- Situaciones en las que hay dificultad para valorar la eficacia o toxicidad del fármaco mediante criterios clínicos. Esto sucede por ejemplo con fármacos profilácticos (anticonvulsivos, antiasmáticos...), o cuando los síntomas de la intoxicación por el fármaco pueden confundirse con los síntomas de la enfermedad que se está intentando tratar (arritmias por digoxina, convulsiones con antiepilépticos, etc.). En el resto de fármacos, en los que sí se pueden usar datos clínicos, estos serán más adecuados para optimizar la terapia que los datos de concentración plasmática, y no será necesario monitorizar los niveles plasmáticos.
- Además de todo esto, también es necesario que exista disponibilidad de una técnica analítica adecuada para poder realizar las determinaciones.

La monitorización suele estar indicada para: controlar las concentraciones plasmáticas al iniciar el tratamiento o tras cambios en la dosis, en casos en los que encontramos falta de respuesta o aparición de efectos adversos con las dosis habituales, situaciones de falta de adherencia al tratamiento o sospecha de sobredosificación, sospecha de interacciones, o en pacientes con características fisiopatológicas que afecten a los parámetros farmacocinéticos o que presentan variantes genéticas que afectan al metabolismo.

MONITORIZACIÓN DE FÁRMACOS EN POBLACIONES ESPECIALES

Existen múltiples factores fisiopatológicos que pueden modificar la cinética de los fármacos, y es muy importante tenerlos en cuenta puesto que en estos pacientes habrá que ajustar la posología de los tratamientos y la monitorización va a ser de gran utilidad.

● Factores fisiológicos

- Edad

Nos encontramos con dos grupos de población a tener en cuenta:

1. **Población pediátrica:** el principal problema que presentan estos pacientes es la gran variabilidad en la cinética de los fármacos entre las distintas edades debido a la maduración de los sistemas fisiológicos. Los niños recién nacidos presentan una mayor proporción de agua corporal total y menor unión a proteínas plasmáticas como la albúmina. Además, la capacidad de las enzimas hepáticas y la función renal están inmaduras. Sin embargo, según van madurando los sistemas enzimáticos durante la infancia, aumentará la capacidad metabólica, pasando a ser mayor incluso que la de los adultos.
2. **Población geriátrica:** este grupo se va a caracterizar por presentar distintas patologías que alteran los parámetros cinéticos unido a que suelen ser pacientes polimedicados con mayor probabilidad de presentar interacciones medicamentosas. Además, independientemente de sus patologías, van a presentar una disminución en la eliminación hepática y renal, por lo que generalmente las dosis iniciales que se emplean deben ser menores. Por último, también hay que tener en cuenta que se trata de pacientes que suelen ser más sensibles a los efectos de la medicación, tanto terapéuticos como adversos.

- Gestación

Durante esta etapa también se modifica la cinética de los fármacos, ya que hay un aumento del peso corporal total (y por tanto del volumen de distribución) y menor concentración de proteínas plasmáticas como la albúmina. Además, hay un aumento de la filtración glomerular con un mayor aclaramiento renal y cambios en la actividad de distintas enzimas hepáticas.

● Factores patológicos

Dentro de este grupo destacan las situaciones de insuficiencia hepática e insuficiencia renal, ya que en estos pacientes es importante realizar ajustes en las dosis para evitar efectos tóxicos como consecuencia de la disminución en el aclaramiento de los fármacos. En los casos de insuficiencia renal, este ajuste habitualmente se lleva a cabo tomando como base el filtrado glomerular, ya que es un parámetro que presenta una gran correlación con el aclaramiento de creatinina y es más fácil de obtener.

Por otro lado, la pérdida de proteínas como la albúmina o la deficiencia en su producción dará lugar a mayores concentraciones de fármaco libre en plasma y habrá riesgo de toxicidad aunque las concentraciones de fármaco total estén dentro del rango terapéutico.

En los casos de insuficiencia cardíaca, debido a la disminución del gasto cardíaco, el flujo sanguíneo se redistribuye hacia órganos principales como el corazón y el SNC, observándose mayores concentraciones en estos tejidos y pudiendo aparecer efectos secundarios en ellos con mayor facilidad.

Además, por este mismo motivo, la perfusión renal y hepática disminuye, lo que dará lugar a una menor eliminación. Todo esto habrá que tenerlo en cuenta a la hora de pautar las dosis de algunos fármacos, que deberán reducirse para evitar efectos tóxicos.

MUESTRAS Y MÉTODOS UTILIZADOS

Según el medicamento a monitorizar habrá cambios en el número y tipo de muestras necesarias, el tiempo de muestreo o la técnica analítica empleada.

- **Tiempo de muestreo**

En el proceso de monitorización de fármacos es muy importante seleccionar un tiempo de muestreo adecuado ya que, de lo contrario, se podrían realizar interpretaciones erróneas que den lugar a falta de eficacia o toxicidad.

En los tratamientos a largo plazo, las sucesivas administraciones del fármaco hacen que las concentraciones en el organismo vayan aumentando de forma progresiva, ya que las nuevas dosis se administran cuando todavía no se han eliminado completamente las anteriores.

En el momento en el que las velocidades de incorporación y eliminación se igualan, se alcanza lo que se conoce como estado de equilibrio estacionario, en el que las concentraciones permanecen constantes y fluctuando entre un valor máximo y un mínimo (Figura 1).

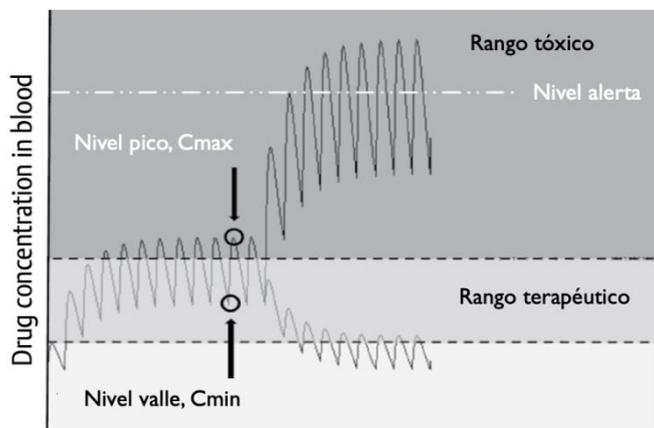


Figura 1. Concentraciones plasmáticas y estado de equilibrio estacionario. Adaptado de: Calvo MV *et al*, 2002.

Estas concentraciones dependerán de la dosis y del aclaramiento del fármaco en el organismo, sin embargo, el tiempo necesario para alcanzar este estado va a depender únicamente de la semivida del fármaco (5-7 semividas) y hay que tenerlo en cuenta cuando se inicia un nuevo tratamiento y tras cualquier modificación del régimen posológico, ya que habrá que esperar a que se alcance un nuevo estado de equilibrio.

En base a lo anterior, la toma de muestras para la monitorización debe realizarse una vez alcanzado el estado de equilibrio estacionario y, dentro de este, en el momento para el cual esté definido el margen terapéutico y la correlación con la respuesta.

Lo más recomendable en la mayoría de las ocasiones suele ser tomar la muestra en la concentración mínima o valle, justo antes de la siguiente dosis, ya que por ejemplo en el caso de la administración oral puede asumirse que el fármaco se ha absorbido y distribuido completamente y además permite saber que se mantienen las concentraciones terapéuticas durante todo el intervalo posológico.

Pero en algunos casos (por ejemplo para evitar efectos tóxicos con los aminoglucósidos o la vancomicina), pueden emplearse también las concentraciones pico o máximas, que deberán tomarse después de que se haya alcanzado el equilibrio de distribución, es decir, una vez que el fármaco se ha distribuido por el organismo y ha alcanzado su lugar de acción.

Generalmente se mide la concentración de fármaco total (libre y unido a proteínas). Aun así, en los fármacos con elevada unión a proteínas plasmáticas, puede ser necesario monitorizar las concentraciones de fármaco libre en aquellas situaciones en las que se producen interacciones y fenómenos de desplazamiento de la unión a proteínas dado el riesgo de toxicidad. Un ejemplo sería los antiepilépticos como la fenitoína o el ácido valproico.

Además, es importante tener en cuenta que en ocasiones los fármacos dan lugar a metabolitos activos que participan en los efectos farmacológicos e incluso en la toxicidad y que puede ser necesario determinarlos, como sucede en el caso de los antidepresivos tricíclicos y antiepilépticos como la carbamazepina.

- **Muestras empleadas**

En cuanto a las muestras utilizadas, se emplean normalmente muestras de suero o plasma, cuyas concentraciones se considera que se encuentran en equilibrio con el lugar de acción del fármaco.

En ocasiones, como en el caso de los inmunosupresores tacrolimus y ciclosporina, el fármaco penetra en alto porcentaje en el interior de los eritrocitos, lo que hace que se emplee sangre total anticoagulada con EDTA para la determinación.

Además, se han desarrollado métodos de análisis en otras muestras como es el caso de la saliva. La determinación en saliva tiene la ventaja de ser una técnica no invasiva. Sin embargo, tiene un procesamiento más complejo y no es útil para todo tipo de fármacos, ya que para la mayoría no se ha podido establecer una correlación con las concentraciones en plasma y por tanto no presenta ventajas respecto a su determinación en suero. Algunos fármacos para los que sí se ha visto que puede ser útil son algunos antiepilépticos o para detectar el consumo de ciertas drogas de abuso.

Otro tipo de muestras en desarrollo es la sangre en papel o *Dried Blood Spots* (DBS), que puede analizarse mediante técnicas como la cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas y que presentan ciertas ventajas sobre todo de cara a pacientes pediátricos, ya que son menos invasivas y requieren menos cantidad de muestra. Aun así, hay que considerar ciertos factores limitantes a la hora de relacionar las concentraciones medidas en este tipo de muestras con las que se obtendrían en plasma, como la

influencia del hematocrito, el volumen de muestra recogida, el tipo de papel de filtro, etc.

- **Métodos de análisis**

Tradicionalmente la determinación de los niveles de fármacos se ha realizado mediante inmunoensayos competitivos debido a su sencillez y comodidad, así como a la rapidez que presentan a la hora de obtener los resultados. En ellos el fármaco de la muestra compite con moléculas de fármaco marcadas (con alguna enzima o reactivo colorimétrico) por la unión a los anticuerpos presentes en el reactivo.

Algunos ejemplos de estos ensayos incluyen: inmunoensayo mediado por enzimas (EMIT), electroquimioluminiscencia (ECLIA), quimioluminiscencia (CMIA), interacción cinética de micropartículas en disolución (KIMS) o inmunoensayo de fluorescencia polarizada (FPIA).

Sin embargo, estos métodos pueden presentar múltiples interferencias con otras sustancias, por ejemplo con los propios metabolitos del fármaco o con determinadas sustancias endógenas, lo que puede dar lugar a resultados falseados.

Como consecuencia se han desarrollado técnicas de análisis cromatográfico (HPLC) que pueden combinarse con espectrometría de masas y que presentan mayor sensibilidad y selectividad, requieren menores cantidades de muestra, permiten analizar más de un fármaco de forma simultánea y pueden emplearse para el análisis de otro tipo de muestras como la sangre papel.

INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS Y AJUSTE TERAPÉUTICO

Una vez que se realizan las determinaciones analíticas de las concentraciones plasmáticas, es fundamental una correcta interpretación de los resultados para realizar los ajustes de dosis necesarios y que la monitorización resulte útil.

Para poder interpretar correctamente las concentraciones obtenidas es necesario conocer información sobre distintos aspectos:

- Características del paciente: datos demográficos (edad, peso, sexo, talla, etc.) y datos clínicos de la enfermedad.
- Características del tratamiento: fármaco, dosis, dosis previas, tiempo de uso, medicación concomitante, margen terapéutico, cinética del fármaco, etc.
- Características de la muestra: tipo de muestra y tiempo de muestreo (si se ha tomado en valle o pico).
- El motivo de la monitorización: sospecha de toxicidad o falta de eficacia, individualización posológica, etc.

Antes de ajustar las dosis es importante definir cuáles son las concentraciones deseadas en el paciente, normalmente según el margen terapéutico. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que este es un parámetro a nivel poblacional y que puede no cumplirse para algunos individuos, por lo que siempre hay que valorar la situación clínica de cada paciente y la concentración que este requiere.

Los siguientes pasos serán establecer el intervalo posológico y la dosis de mantenimiento más adecuada a cada situación para poder alcanzar estas concentraciones.

A la hora de realizar los ajustes de dosis, para muchos fármacos es necesario conocer los parámetros cinéticos que se dan en el paciente concreto. Para realizar los estudios farmacocinéticos, se han desarrollado distintos modelos matemáticos que permiten interpretar la evolución de las concentraciones en el organismo a lo largo del tiempo. Los más conocidos son los modelos compartimentales y dentro de estos el más sencillo es el modelo monocompartimental.

Sin embargo, calcular los parámetros farmacocinéticos de forma individual para cada paciente es complejo en la práctica clínica diaria, ya que requeriría estudios completos de las concentraciones sanguíneas de fármaco a lo largo del tiempo. Por ello, existen distintos programas informáticos que, gracias al uso de métodos estadísticos de estimación bayesiana, permiten estimar los parámetros individuales a partir de parámetros farmacocinéticos poblacionales (de poblaciones fisiopatológicamente similares al paciente), empleando únicamente concentraciones sanguíneas puntuales del fármaco en el individuo.

PRINCIPALES GRUPOS DE FÁRMACOS MONITORIZADOS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

- **Antiepilépticos**

Por lo general, los antiepilépticos son fármacos en los que la monitorización está muy bien establecida (sobre todo en los de primera generación), siendo muy importante para asegurar el cumplimiento.

Suelen presentar una elevada unión a proteínas plasmáticas (fenitoína, valproico) y aunque generalmente se miden las concentraciones de fármaco total, en los casos de hipoalbuminemia o en los que hay interacciones por desplazamiento puede ser interesante determinar la fracción de fármaco libre.

Además, presentan múltiples interacciones a nivel de su metabolismo hepático por el citocromo P450, sobre todo cuando se combinan entre ellos, ya que muchos actúan como inductores o inhibidores del metabolismo, y al mismo tiempo su propio metabolismo se ve afectado por otros.

Por ejemplo, carbamazepina, fenobarbital y fenitoína son fármacos inductores mientras que el valproico es inhibidor. Incluso algunos, como en el caso de la carbamazepina van a actuar como autoinductores de su propio metabolismo.

También es importante tener en cuenta que varios de estos fármacos van a tener metabolitos farmacológicamente activos que pueden ser responsables de efectos adversos y que por tanto también es necesario monitorizar (como en el caso de la carbamazepina y oxcarbazepina).

Algunos de los antiepilépticos comúnmente monitorizados así como sus márgenes terapéuticos están recogidos en la Tabla 1.

Dentro de los principales efectos adversos que pueden producirse en los pacientes debido a dosis elevadas o

intoxicaciones se incluyen efectos depresores a nivel del SNC (fatiga, somnolencia, ataxia, nistagmo).

	Rango terapéutico
Carbamazepina	4-12 µg/ml
Ácido valproico	50-100 µg/ml
Fenitoína	10-20 µg/ml
Fenobarbital	15-40 µg/ml
Lamotrigina	3-14 µg/ml
Levetiracetam	10-37 µg/ml
Oxcarbazepina	10-35 µg/ml
Etosuximida	30-100 µg/ml

Tabla 1. Antiepilépticos: márgenes terapéuticos. Adaptado de: Gómez I *et al*, 2016.

- **Inmunosupresores**

Dentro de este grupo farmacológico destacan los inhibidores de la calcineurina, como la ciclosporina y el tacrolimus y los inhibidores de mTOR como everolimus y sirolimus.

La monitorización de los inmunosupresores se realiza sobre todo para asegurar el cumplimiento terapéutico de los pacientes y evitar el empeoramiento de la enfermedad y el rechazo de los órganos; así como para evitar toxicidad por elevadas dosis.

Las muestras necesarias para la determinación de inmunosupresores van a ser sangre total, debido a que presentan una elevada unión a los eritrocitos (60%).

Los niveles óptimos de estos fármacos van a depender del tipo de trasplante, así como del tiempo transcurrido y las combinaciones de tratamiento con otros inmunosupresores (que normalmente hacen que las dosis requeridas sean menores). Aun así, se recogen unas concentraciones terapéuticas a nivel general para cada uno de estos fármacos (Tabla 2).

	Rango terapéutico
Ciclosporina	100-300 ng/ml inducción 50-200 ng/ml mantenimiento
Tacrolimus	10-15 ng/ml inducción 5-10 ng/ml mantenimiento
Everolimus	4-8 ng/ml
Sirolimus	10-20 ng/ml 4-12 ng/ml (combinado con inhibidores de calcineurina)

Tabla 2. Inmunosupresores: márgenes terapéuticos. Adaptado de: Gómez I *et al*, 2016.

Es importante controlar los niveles de fármaco tanto al inicio del tratamiento (en el postrasplante inmediato) como a largo plazo, debido a la amplia variabilidad interindividual y a las interacciones cuando se combinan con otros inmunosupresores o con otros medicamentos a nivel del metabolismo hepático.

Además del aumento en el riesgo de infecciones, los principales efectos adversos incluyen nefrotoxicidad, hipertensión y alteraciones neurológicas (cefalea y temblor) en el caso de los inhibidores de la calcineurina. Con los inhibidores de mTOR como everolimus y sirolimus, son más comunes la hipertrigliceridemia, mielosupresión y las alteraciones gastrointestinales.

- **Antidepresivos tricíclicos**

La monitorización de antidepresivos tricíclicos se recomienda, como en el resto de fármacos mencionados, para evitar efectos tóxicos y asegurar la eficacia.

Destaca el hecho de que suelen monitorizarse junto con sus principales metabolitos puesto que estos son también activos y podrían contribuir a la toxicidad. Este es el caso de la amitriptilina/nortriptilina (con un rango terapéutico entre 80-200 ng/ml) y el de la imipramina/desipramina (175-300 ng/ml).

La toxicidad por elevadas dosis se va a deber fundamentalmente a efectos anticolinérgicos, así como a alteraciones cardíacas en la conducción con arritmias y sedación.

- **Antibióticos**

Los antibióticos como los aminoglucósidos y la vancomicina se monitorizan no solo para asegurar concentraciones bactericidas que aseguren la eficacia del tratamiento, sino también para evitar la nefrotoxicidad y ototoxicidad típicas de estos fármacos, ya que tienen unos márgenes terapéuticos muy estrechos.

Además, se caracterizan porque para el control de la terapia se emplean tanto concentraciones pico como valle, y esto hay que tenerlo en cuenta a la hora de valorar los niveles plasmáticos. Por ejemplo, en el caso de la amikacina el rango terapéutico se encuentra entre 15-25 µg/ml en pico y <5 µg/ml en valle. Y en el caso de la vancomicina los valores son de 20-40 µg/ml en pico y de 5-15 µg/ml en valle.

- **Metotrexato**

En cuanto a la monitorización del metotrexato, es importante debido a su elevada toxicidad y para controlar las dosis de rescate con ácido fólico (leucovorin). Suele medirse a las 24, 48 y 72 horas de la administración y los niveles van a depender del protocolo de tratamiento, que varía según el tipo de tumor, edad, superficie corporal, etc. De forma aproximada, se puede considerar que habrá toxicidad con valores por encima de 10 µmol/L a las 24h, 1 µmol/L a las 48h y 0,1 µmol/L a las 72h.

Los efectos tóxicos incluyen afectación renal, hepática, mielosupresión, mucositis y neurotoxicidad.

- **Digoxina**

Tiene un intervalo terapéutico estrecho (0,8-2 ng/ml) y es frecuente la aparición de intoxicaciones tanto agudas como

crónicas. Uno de los principales problemas en estos casos es que los síntomas de la intoxicación por digoxina se asemejan a los de la enfermedad tratada por el fármaco, ya que cursan con arritmias.

Además hay que tener en cuenta que los niveles plasmáticos no siempre se corresponden bien con el grado de intoxicación, por lo que es necesario combinar la información de laboratorio con la clínica del paciente.

Su eliminación va a ser fundamentalmente renal, por lo que habrá que tener precaución con los pacientes con insuficiencia renal, ya que el fármaco tenderá a acumularse y pueden presentar intoxicaciones crónicas. Y también es importante tener en cuenta que su acción depende de los niveles de potasio: la hipopotasemia va a aumentar sus efectos y por tanto su toxicidad.

- **Litio**

Su principal característica es que presenta un margen terapéutico muy estrecho (0,6-1,2 mmol/L) que justifica su monitorización por motivos de seguridad para evitar posibles efectos tóxicos.

Las intoxicaciones suelen cursar con síntomas neurológicos, renales, digestivos y cardiovasculares (con alteraciones del electrocardiograma). Además pueden producirse intoxicaciones agudas o crónicas, estas últimas sobre todo en pacientes con insuficiencia renal, y al igual que en el caso de la digoxina, muchas veces los niveles no se correlacionan adecuadamente con la gravedad de la clínica.

Finalmente hay que tener en cuenta que es un fármaco que debe determinarse en suero por la interferencia con la heparina de litio usada como anticoagulante.

- **Paracetamol y salicilatos**

La determinación de sus niveles se emplea fundamentalmente en casos de intoxicaciones. Existen nomogramas establecidos como el de Rumack-Matthew para el paracetamol y el de Done con los salicilatos, que permiten estimar mejor la gravedad de la intoxicación relacionando las concentraciones plasmáticas y el tiempo transcurrido desde la ingesta.

- **Paracetamol**

El paracetamol a elevadas concentraciones presenta hepatotoxicidad por la formación del metabolito tóxico N-acetil-p-benzoquinoneimina.

En los casos de intoxicaciones, las concentraciones deben medirse a partir de las 4 horas para confirmar que se ha producido la absorción completa de la dosis ingerida, y en función de los resultados y siguiendo el nomograma de Rumack-Matthew se pautará la administración del antídoto N-acetilcisteína (Figura 2).

Se consideran críticos valores superiores a 150 µg/ml a las 4 horas de la ingesta y hay que tener en cuenta que normalmente el antídoto es más efectivo cuando se administra en las primeras 6-8 horas.

- **Salicilatos**

Las intoxicaciones por salicilato van a causar alteraciones ácido-base (inicialmente alcalosis respiratoria por

hiperventilación seguido de una acidosis metabólica por desacople de la cadena respiratoria y aumento del metabolismo anaerobio), alteraciones gastrointestinales y afectación del SNC que puede derivar en coma.

Los niveles plasmáticos se deben medir 6 horas después de la ingesta y la toxicidad se determina en función del nomograma de Done (Figura 3). A nivel general se consideran críticos unos niveles superiores a 40 mg/dl a las seis horas. Sin embargo, se recomienda realizar determinaciones seriadas ya que el fármaco puede acumularse a nivel intracelular y dar concentraciones menores que no se asocian con la gravedad real, ya que cambios en el pH van a afectar a la distribución de los salicilatos en el organismo.

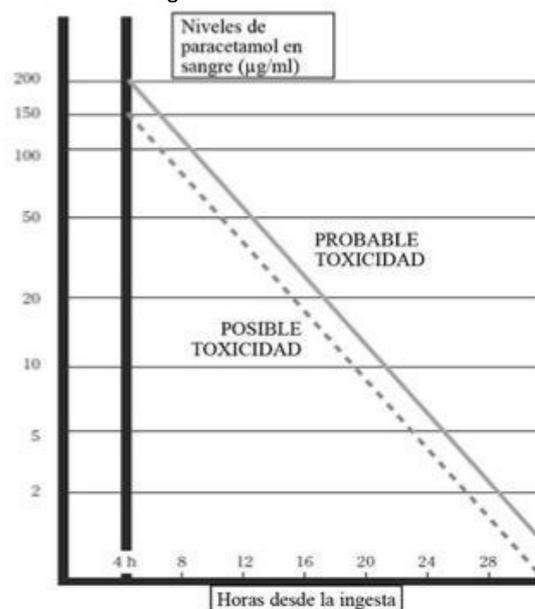


Figura 2. Nomograma de Rumack-Matthew. Tomado de: Sánchez A *et al*, 2016.

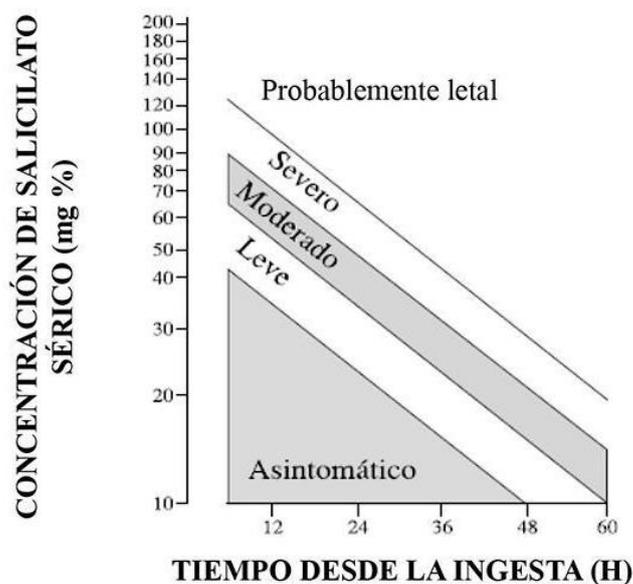


Figura 3. Nomograma de Done. Tomado de: Sánchez A *et al*, 2016.

CONCLUSIONES

La monitorización de fármacos es un proceso que permite optimizar los tratamientos farmacológicos mejorando de forma global tanto su eficacia como la seguridad, ya que por un lado se individualizan las dosis y al mismo tiempo se asegura el cumplimiento terapéutico del paciente, lo que al final conlleva una mejora de su enfermedad y una disminución del coste global del tratamiento.

De cara al futuro, el objetivo es desarrollar una terapia farmacológica cada vez más personalizada gracias al desarrollo de nuevas técnicas analíticas y a la realización de estudios que faciliten la interpretación de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Ark Diagnostics. Ficha técnica Ark Methotrexate Assay. Sunnyvale, CA: Ark Diagnostics; 2011
- Calvo MV, García MJ, Martínez J, Fernández MM. Farmacocinética clínica. Farmacia Hospitalaria, tomo I [Internet]. Madrid: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria; 2002 [citado 15-05-2021]. Disponible en: <http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo1/cap212.pdf>
- Doménech J, Martínez J, Peraire C. Tratado general de biofarmacia y farmacocinética. Madrid: Editorial Síntesis; 2013.
- Escobar L. Monitorización terapéutica de fármacos y aspectos prácticos de farmacocinética, Rev Med Clin Condes. 2016; 27(5):605-14.
- Gómez I, Fernández A, Delmiro A. Monitorización de fármacos. En: Suárez D, Vargas JC, Salas J, et al., ed. Manual de diagnóstico y terapéutica médica. 8ª ed. Madrid: MSD; 2016. p. 1627-35.
- Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, Conca A, Deckert J, Domschke K, et al. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. Pharmacopsychiatry. 2018 Jan;51(1-2):9-62.
- Kang JS, Lee MH. Overview of therapeutic drug monitoring. Korean. J Intern Med. 2009;24(1):1-10.
- Patsalos PN, Spencer EP, Berry DJ. Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs in Epilepsy: A 2018 Update. Ther Drug Monit. 2018;40(5):526-48.
- Sádaba B. Monitorización y efectos secundarios de los inmunosupresores en el trasplante. An Sist Sanit Navar. 2006;29 Suppl 2:207-18.
- Sánchez A, Valdeolivas N, Jorge L, Moreno A. Intoxicaciones. En: Suárez D, Vargas JC, Salas J, et al., ed. Manual de diagnóstico y terapéutica médica. 8ª ed. Madrid: MSD; 2016. p. 1565-1600.

MARCADORES TUMORALES

Autores: Irene González Martínez; Adrián González Quintana; Ilenia Liria González

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

Palabras clave: Neoplasia, Marcadores tumorales

INTRODUCCIÓN

El cáncer es, junto con las enfermedades cardiovasculares, una de las principales causas de mortalidad en la población occidental de entre 35 y 65 años. En 2019, se diagnosticaron en España 277.234 nuevos casos, según la Sociedad Española de Oncología Médica¹, por lo que constituye un importante problema de salud pública, con un elevado coste socioeconómico. La mortalidad asociada con el cáncer depende del tipo de tumor y del momento en que se detecte, por lo que en general, cuanto más pronto se produzca la detección más fácil será el tratamiento.

El término cáncer, también conocido como neoplasia, agrupa más de un centenar de enfermedades que se caracterizan por la aparición en un tejido, de una serie de células que poseen como característica más importante una capacidad proliferativa muy elevada y una falta de respuesta a los procesos biológicos de regulación. En su evolución natural, las células neoplásicas son capaces de invadir tejidos, diseminarse y colonizar a distancia. Las diferencias entre las células normales y neoplásicas pueden ser utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad. Estas diferencias, desde el punto de vista morfológico y estructural, han sido empleadas clásicamente por los patólogos para establecer el diagnóstico de neoplasia. Además, dichas diferencias van acompañadas por cambios bioquímicos, inmunológicos y genéticos alguno de los cuales pueden ser detectados a nivel periférico, como es el caso de los marcadores tumorales.

MARCADORES TUMORALES

Los marcadores tumorales (MT) desde un punto de vista clásico, son toda sustancia producida por las células tumorales o por el "huésped", cuya presencia pueda ser detectada en suero u otros líquidos biológicos y que puede usarse para el diagnóstico, seguimiento, pronóstico o detección de recidivas. Por tanto, los MT se comportan como señales a distancia de la presencia de una enfermedad neoplásica. Sin embargo, estos marcadores no son específicos de las neoplasias, pudiendo encontrarse concentraciones apreciables en gran número de situaciones fisiológicas o patológicas no tumorales, dando lugar a falsos positivos o bien, en algunos casos, no se aprecia nunca elevación de los MT, especialmente en etapas tempranas de la enfermedad dando lugar a falsos negativos.

Por tanto, el marcador tumoral ideal cumpliría las siguientes características:

- Ser específico del tumor (solo detectarse en presencia del tumor).
- Detectarse fácilmente en líquidos biológicos.
- Detectarse a etapas tempranas de la enfermedad.

- Su concentración debe correlacionarse con el estado tumoral.
- Debe presentar concentraciones estables sin fluctuaciones biológicas de manera que la concentración cambie por la biología del tumor.

Es decir, el marcador tumoral ideal es aquel que tenga una sensibilidad y especificidad diagnóstica del 100%. Desgraciadamente, como se comentará más adelante, la mayoría de los MT conocidos en la actualidad no cumplen todos estos requisitos y, por tanto, no existe un marcador tumoral ideal.

Los marcadores tumorales abarcan un amplio grupo de sustancias que pueden ser clasificadas según diversos criterios. Inicialmente, se propuso una clasificación basada en el origen de los marcadores (Tabla 1), existiendo dos grandes grupos: los producidos por las células tumorales y los producidos por el huésped en respuesta a la presencia del tumor. La mayoría de los marcadores tumorales corresponden al primer grupo, aunque hay varios de ellos que podrían estar en ambos. En general, esta clasificación tiene poca utilidad desde un punto de vista clínico.

Debido a ello, se propuso la clasificación según la sensibilidad y especificidad de los marcadores, ya que estas características, determinan su significado clínico. Esta clasificación divide a los marcadores en 4 grupos:

- MT de muy elevada especificidad. A este grupo pertenecen la gonadotropina coriónica humana (β -HCG) y la calcitonina. En el caso de la β -HCG, en hombres y en ausencia de embarazo su elevación indicaría un tumor testicular o un coriocarcinoma, respectivamente. Mientras que concentraciones elevadas de calcitonina son de gran utilidad para el diagnóstico precoz de cáncer medular de tiroides.
- MT de especificidad elevada. Tienen una sensibilidad y especificidad baja en los estadios iniciales, pero en estadios más avanzados permiten asegurar la presencia de un tumor. Pertenecen a este grupo el antígeno prostático específico (PSA) y la tiroglobulina (TG) utilizados en el cáncer de próstata y cáncer de tiroides, respectivamente. En pacientes tratados con prostatectomía radical o tiroidectomía radical estos marcadores se comportan con una muy elevada especificidad, por lo que una elevación de estos MT definiría la existencia de una recidiva del tumor.
- MT de especificidad intermedia. Incluyen a la mayoría de marcadores tumorales utilizados en la práctica clínica. Se observan concentraciones elevadas en diversas patologías.

- **MT de baja especificidad.** La sensibilidad depende del estadio, pero su especificidad es baja incluso en fases avanzadas. Pertenecen a este grupo las citoqueratinas como: TPA (antígeno polipeptídico tisular), TPS (antígeno polipeptídico tisular específico) y CYFRA 21.1; así como la LDH y otros reactivos de fase aguda.

- **Determinación de los marcadores tumorales**

Existen distintos métodos de inmunoanálisis que, en base al empleo de anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador, permiten realizar una amplia variedad de estos test. Sin embargo, la automatización no ha mejorado totalmente las deficiencias en la intercambiabilidad de resultados obtenidos con distintos sistemas analíticos. Esto se debe al empleo de distintos anticuerpos monoclonales y diferencias en los tiempos de incubación y efecto matriz. Todo ello, imposibilita la interpretación de resultados cuando el seguimiento se hace con métodos diferentes. Además, otro factor que influye en la falta de intercambiabilidad es la falta de material de referencia.

Entre otros factores, la estandarización requiere de la existencia de un estándar con características iguales al analito que se quiere medir. El primer problema es que los marcadores tumorales son analitos heterogéneos con un grado variable de glicosilación y cuya estructura no ha sido en todos los casos completamente identificada. Por ello, son muchos los marcadores tumorales reconocidos mediante el empleo de determinados anticuerpos sin que se conozca plenamente su estructura. Debido a ellos, solo se han podido desarrollar estándares internacionales en los casos en que se conoce la estructura íntegra del marcador tumoral y son la AFP, CEA, β -HCG, PSA y PSA libre, TG y Calcitonina (Tabla 2).

- **Optimización del uso de los marcadores tumorales**

La concentración plasmática de un marcador tumoral viene determinada por una serie de características propias del tumor, entre las que se incluyen:

- Tamaño y estadio: en general, cuanto más grande sea el tumor o más avanzado sea su estadio, mayor será la concentración de marcador.
- Grado de diferenciación celular.
- Distintas variedades histológicas: factor clave para la expresión de un marcador tumoral.
- Grado de vascularización del tumor.

Ante la detección de un valor elevado de cualquier marcador, es necesario discriminar si dicha elevación es debida o no a la presencia de una neoplasia, y para ello se utilizan tres criterios: evaluar la concentración sérica del marcador, descartar patología benigna y realizar un control evolutivo.

Hay que evaluar la concentración sérica del marcador, ya que, los incrementos plasmáticos en patologías benignas suelen ser moderados, existiendo ciertos valores por encima de los cuales hay una alta sospecha de neoplasia. Además, hay que descartar que la elevación se deba a una patología benigna. Hay numerosas situaciones fisiológicas por las

cuales se pueden encontrar marcadores tumorales elevados, por lo que hay que conocer las causas ajenas al desarrollo del tumor que puede producir estos falsos positivos y así mejorar la especificidad.

Finalmente, es necesario realizar un control evolutivo o estudio secuencial, ya que el hallazgo aislado de una elevación de cualquier marcador tiene un valor limitado, siendo necesario realizar dos o tres determinaciones seriadas en un intervalo de tiempo superior al de su vida media plasmática. En general, el plazo mínimo que debe transcurrir es de 15-20 días y debe haber un incremento continuo a lo largo del tiempo superior al 20-25% para considerarse significativos.

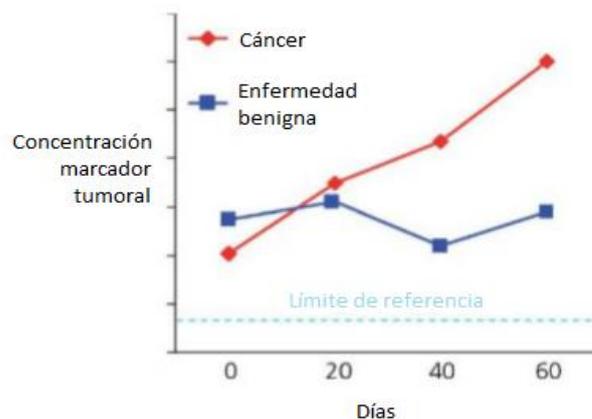


Figura 1. Evolución de la concentración de MT en una neoplasia vs en patología benigna. Adaptado de: González Hernández A, 2014.

UTILIDAD DE LOS MARCADORES TUMORALES

- **Cribado y diagnóstico precoz:**

El valor diagnóstico de un marcador tumoral viene definido por su sensibilidad y especificidad, así como por el valor predictivo obtenido. Las guías diagnósticas no avalan el empleo de marcadores tumorales con fines diagnósticos ya que estos no tienen suficiente sensibilidad y especificidad. A pesar de que existen MT utilizados en programas de cribado, como el PSA, estos programas no solo deben basarse en la eficacia diagnóstica, sino también, en su incidencia en la supervivencia y mortalidad debida al tumor. Actualmente, el cribado de cáncer de próstata con PSA se encuentra en evaluación.

- **Monitorización del tratamiento y detección precoz de recidiva:**

La monitorización del tratamiento y detección precoz de las recidivas, son las principales aplicaciones de los marcadores tumorales. La concentración de un marcador tras la realización de un tratamiento con finalidad curativa debe disminuir hasta normalizarse. Además, la elevación de un marcador en un paciente en seguimiento puede interpretarse como indicativo de recidiva del tumor. Por ejemplo, la monitorización de tiroglobulina y PSA permiten realizar con gran fiabilidad el seguimiento de pacientes tratados con

Origen	Tipos	Marcador
Producido por las células tumorales	Antígenos oncofetales	AFP, CEA
	Antígenos oncoplacentarios	β -HCG, Fosfatasa alcalina placentaria, glicoproteína específica del embarazo beta-2
	Mucinas	Antígenos CA 15.3, CA 125, CA 19.9, CA 72.4
	Antígenos tisulares	SCC, S-100, ProGRP
	Hormonas	Tiroglobulina, calcitonina, ACTH, ADH
	Enzimas	NSE, Fosfatasa alcalina placentaria, PSA, Metaloproteinasas, LDH
	Oncoproteínas	Her-2-neu
	Proteínas específicas	Inmunoglobulinas
Producido en respuesta a la presencia del tumor	Citoqueratinas	CYFRA 21-1, TPA, TPS
	Respuesta del huésped	Citocinas, β -2-microglobulina, proteínas de fase aguda

Tabla 1. Clasificación según el origen de los biomarcadores. Adaptado de: Fernández Suárez A. 2007.

Marcador tumoral	Material internacional de referencia
AFP	<i>1st International Standard, 72/225, 1975</i>
CEA	<i>1st International Reference Preparation 73/601, 1975</i>
HCG	<i>1st International Reference Preparation para β-HCG, 75/551, 1974; 4th International Standard para HCG, 75/589, 1999; 5th International Standard para HCG, 07/364, 2009</i>
PSA	<i>1st Reference Reagent 96/670, 1999</i>
PSA libre	<i>1st Reference Reagent 96/668, 1999</i>
Tiroglobulina	<i>Certificate Reference Material 457, de la Comisión de la Comunidad Europea, 1996</i>
Calcitonina	<i>2nd International Standard 89/620, 1991</i>

Tabla 2. Marcadores tumorales y su material internacional de referencia. Adaptado de: Filella X, 2013.

Marcador	Tumor asociado	Falsos positivos
AFP	Hígado; Testículo; Seno endodérmico	Hepatopatías
CEA	Neoplasias intestinales, digestivas; medular de tiroides; mama; pulmón	Hepatopatías; Insuficiencia renal; EPOC
β -HCG	Tumores trofoblásticos; Testículo	insuficiencia renal; embarazo

Calcitonina	Carcinoma medular de tiroides	Insuficiencia renal
Tiroglobulina	Carcinoma papilar y folicular de tiroides	Tiroiditis; Embarazo
CA 125	Ovario; Endometrio; Pulmón	Derrames serosos; Insuficiencia renal; Endometriosis
CA 19.9	Páncreas; Estómago; Colon y recto; Ovario	Ictericia; Insuficiencia renal
CA 15.3	Mama; Ovario	Hepatopatías; Insuficiencia renal
CA 72.4	Estómago; Colon y recto; Páncreas; Ovario	Hepatopatías; Insuficiencia renal; tratamiento con AINES
CYFRA 21-1	Neoplasias epiteliales	Hepatopatías; Insuficiencia renal
PSA	Próstata	Prostatitis; Hiperplasia benigna de próstata
NSE	Pulmón células pequeñas; Carcinoide; Wilms	Hemólisis; Insuficiencia renal; traumatismos cerebrales
SCC	Carcinomas epidermoides	Insuficiencia renal; Eccemas; enfermedades dermatológicas
HER2/neu	Mama; Ovario; Próstata; Pulmón	Hepatopatías
5-HIAA	Carcinoide	Factores alimentarios

Tabla 3. Patologías benignas que pueden producir elevación de los distintos marcadores tumorales. Adaptado de: Fernández Suárez A. 2007.

tiroidectomía radical o prostatectomía radical ya que una elevación de la concentración de los mismos indicaría recidiva con gran seguridad.

PRINCIPALES MARCADORES TUMORALES

- **CEA o antígeno carcinoembrionario**

Es una glicoproteína (180kDa) que pertenece a una familia de glicoproteínas codificadas por unos 10 genes localizados en dos áreas del cromosoma 19. Aunque su función fisiológica es desconocida, parece estar relacionada con la adhesión y reconocimiento celular. La concentración de CEA en adultos sanos, es menor de 5 mg/dL y su elevación se produce en numerosos adenocarcinomas, sobre todos en el colorrectal, mama, pulmón y gástrico. También se encuentra elevada en fumadores (cifras entre 5 y 10 mg/dL) o en patologías como la cirrosis hepática, insuficiencia renal, EPOC y enfermedades inflamatorias del tracto digestivo.

- **PSA (antígeno prostático específico)**

Pertenece a la familia de las calicreínas. Se sintetiza exclusivamente en la glándula prostática y es secretado al líquido seminal donde participa en la licuefacción del coágulo seminal alcanzándose unas concentraciones muy elevadas. En condiciones normales, solo una fracción mínima se libera a la circulación y se encuentra elevado en el cáncer de próstata, prostatitis e hiperplasia benigna de próstata.

En la actualidad el PSA es uno de los marcadores tumorales más utilizados en la rutina clínica, usándose

fundamentalmente, junto con otras pruebas, como el tacto rectal y la ultrasonografía transrectal, en programas de cribaje y diagnóstico precoz de tumores de próstata; pero también en seguimiento clínico, valoración de tratamientos y detección precoz de recidivas en pacientes con cáncer de próstata.

- **Calcitonina**

Es una hormona proteica secretada por las células de los carcinomas medulares de tiroides que son neoplasias neuroendocrinas derivados de las células C parafoliculares. Las concentraciones de este marcador en condiciones normales son menores a 5 pg/mL en mujeres y menores a 8,4 pg/mL en hombres.

- **Tiroglobulina**

Es producida por las células foliculares tiroideas normales o neoplásicas. Se encuentra elevada en el cáncer diferenciado de tiroides y su concentración en condiciones normales es de entre 3,5-77 ng/mL. Para el seguimiento del cáncer de tiroides es importante realizar una determinación de anticuerpos anti-tiroglobulina (ATG), ya que en ocasiones los resultados de TG están infravalorados debido a la presencia de los mismos, en este caso el seguimiento se realizaría con los ATG como marcador sustitutivo.

- **β-HCG**

Es una hormona glucoproteica sintetizada por las células del sincitiotrofoblasto de la placenta. Fuera del periodo de embarazo, no se detecta en adultos sanos por lo que una

elevación de la misma indicaría la presencia de tumores trofoblásticos, testiculares no seminomatosos y tumores derivados de células germinales.

- **Alfa-fetoproteína (AFP)**

Es una glicoproteína (69 KDa) que presenta una composición similar a la albúmina. Su función es el transporte de sustancias como ácidos grasos, bilirrubina, Cu y Zn. Pocas semanas después del nacimiento, la concentración sérica de AFP desciende drásticamente situándose en adultos sanos por debajo de los 10 ng/dL. Los valores séricos de AFP se incrementan de forma moderada en la cirrosis hepática y de forma elevada en el cáncer primitivo de hígado y tumores testiculares no seminomatosos.

- **Enolasa neuronal específica (NSE)**

Es la isoforma gamma de la enolasa (39kDa) y se sintetiza en las neuronas y las células neuroendocrinas. Es el marcador empleado en el estudio de tumores neuroectodérmicos y carcinomas de pulmón indiferenciados de células pequeñas. Su rango normal es inferior a 16,3 ng/mL y se encuentra elevada en las muestras hemolizadas, en traumatismos cerebrales, septicemias y en la insuficiencia renal siendo una causa frecuente de falsos positivos.

- **SCC o antígeno asociado a los carcinomas escamosos**

Es una glucoproteína sintetizada por los tejidos escamosos que pertenece a la familia de inhibidores de las serinproteasas. Su rango en condiciones normales es menor de 2,5 ng/mL y se utiliza como marcador en el estudio de cánceres de células escamosas: laringe, esófago, pulmón, cuello, cabeza y cervix.

- **Citoqueratinas**

Son un conjunto de proteínas que polimerizan formando los filamentos del citoesqueleto de las células epiteliales. Hay tres tipos de citoqueratinas que se emplean como marcadores tumorales el TPA, TPS y CYFRA 21-1.

- **Antígenos carbohidratados**

Estos marcadores tumorales corresponden a anticuerpos que reconocen antígenos carbohidratados liberados por las células tumorales.

- **CA 125**

Es una glucoproteína mucínica de elevado peso molecular sintetizada por las células de los conductos de Muller (trompas de Falopio, cuello uterino y fondo vaginal) y en el mesotelio. Las concentraciones normales de este marcador son inferiores a 35 U/mL y es el marcador de elección en el estudio de carcinomas ováricos. Se pueden encontrar valores séricos por encima de este límite, en procesos como peritonitis, derrames pleurales, pericárdicos, ascíticos y en la endometriosis

- **CA 19.9**

El anticuerpo CA 19.9 reconoce un gangliósido con el grupo sialil del antígeno de Lewis a. Existe un 5% de la población, que no expresa el grupo sialil del antígeno de Lewis a, y en este caso da lugar a falsos negativos. El CA 19.9 se expresa en el aparato gastrointestinal y se emplea en neoplasias de

este origen, en especial en cáncer de páncreas, aunque se pueden encontrar elevaciones en tumores mamarios, ováricos (tipo mucinoso) y pulmonares.

- **CA 15.3**

Reconocen al antígeno MUC-1. Las concentraciones normales de este marcador son inferiores a 28 U/mL y se eleva en tumores de mama y ovario.

- **CA 72-4**

El anticuerpo frente a CA 72-4 reconoce la glucoproteína de elevado peso molecular TAG-72. El CA 72-4 se emplea, sobre todo, en el cáncer gastrointestinal. Es el marcador con mayor sensibilidad y especificidad en el cáncer gástrico y se emplea en el seguimiento de la enfermedad.

APLICACIÓN DE LOS MARCADORES TUMORALES

- **Cáncer de ovario**

El cáncer de ovario es la sexta causa de cáncer en mujeres y la primera causa de mortalidad por cáncer ginecológico. Su incidencia aumenta con la edad, siendo más frecuente en las mujeres postmenopáusicas. La alta tasa de mortalidad se debe principalmente a su detección en estadios ya avanzados, debido a que no suelen presentar síntomas, o bien, cuando aparecen, no son específicos.

Los tumores de ovario son un grupo de neoplasias diversas por su epidemiología e histogénesis. El 90% de los cánceres de ovario son tumores epiteliales y dependiendo del tipo celular afectado podemos distinguir entre carcinoma seroso (80%) o mucinoso.

Aunque la edad avanzada se considera el factor de riesgo más importante, también hay que tener en cuenta otros factores que se asocian con mayor prevalencia como la historia familiar de cáncer de ovario, ya que, en torno al 10% son hereditarios asociados a mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

- **Marcadores tumorales en cáncer de ovario**

Los marcadores tumorales más empleados en el manejo del cáncer de ovario son:

- CEA: se utiliza como marcador estándar de neoplasias epiteliales con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 88% y su rango normal en individuos sanos es inferior a 5 ng/ml.
- Ca 125: se considera el marcador tumoral estándar en el seguimiento de la terapia en las mujeres con cáncer epitelial de ovario. Dicho marcador se expresa en la mayoría de los adenocarcinomas serosos, al contrario que en los tumores mucinosos cuya expresión es menos frecuente. Aunque también se eleva en otros tipos de cáncer (mama, pulmón, colón) cuando se encuentran concentraciones superiores a 1500 U/L se puede sospechar de un cáncer de ovario. El uso de este marcador se basa principalmente en el control del estado basal previo al tratamiento de las pacientes con cáncer ovárico conocido, para la detección de recurrencia y para la evaluación de la progresión de

la enfermedad, ya que la sensibilidad diagnóstica del CA 125 se relaciona con el estadio del tumor.

- Proteína del epidídimo humano (He-4): su expresión es específica del tejido del aparato reproductor y, de forma más pronunciada, en tumores epiteliales de ovario. He-4 muestra una sensibilidad diagnóstica similar al CA 125 para el cáncer de ovario y mayor especificidad sin dar una tasa tan elevada de falsos positivos. Sin embargo, presenta un uso limitado en pacientes con insuficiencia renal y hay que considerar distintos rangos de referencia en función de si el análisis es en mujeres premenopáusicas (He-4 <90 pmol/L) o postmenopáusicas (He-4 <150 pmol/L).

Además de los marcadores mencionados, existen otros que pueden resultar de utilidad:

- El CA 19.9 se eleva en los tumores de ovario mucinosos.
- CA 15.3 puede ser de utilidad ya que los tumores de ovario suelen metastatizar a la mama.
- En cuanto a nuevos marcadores cabe mencionar, el test OVA1® que emplea como herramienta diagnóstica un panel de 5 marcadores: CA 125, transtiretina, Apo A1, β -2-microglobulina y transferrina (validados mediante análisis proteómico, SELDI). El software específico llamado OvaCalc® calcula el riesgo de cáncer de ovario, mediante una escala de puntuación de 0 a 10, comparando en base a puntos de corte predeterminados. Así, las mujeres premenopáusicas suelen presentar un punto de corte de 5,0, mientras que las mujeres postmenopáusicas tienen un punto de corte menor, de 4,4. Hay que resaltar que un alto valor de OVA1® no es diagnóstico de cáncer, sino que marca un

aumento del riesgo y una posible indicación de remisión al ginecólogo u oncólogo.

- El algoritmo de riesgo de malignidad ovárica ROMA es un índice predictivo que mediante un algoritmo asigna riesgo de malignidad a mujeres que presentan una masa pélvica. El algoritmo incorpora la medición de los marcadores tumorales séricos CA 125 y He4 mediante inmunoensayo y la edad (menopausia). El algoritmo ROMA es útil para distinguir cáncer epitelial de ovario de masa pélvica benigna con un elevado rendimiento diagnóstico (AUC: 0,93). ROMA es menos específico (0,83 frente a 0,93) pero más sensible que He-4 (0,89 vs 0,79).

- Recomendaciones de las guías de práctica clínica

Actualmente, las guías de práctica clínica de diferentes sociedades sobre el uso de CA 125 en el cáncer epitelial de ovario recomiendan su uso para la monitorización de terapia, detección de recidivas y pronóstico (Tabla 4). El cribado de cáncer de ovario sólo se aconseja en la población de riesgo (historia familiar de cáncer de ovario, portadoras de mutaciones en *BRCA*, alteración de genes reparadores *HNPCC*).

- Perspectivas futuras

Actualmente, gran parte de las investigaciones se centran en mejorar las herramientas diagnósticas para identificar marcadores o técnicas de imagen adicionales que complementen al CA 125 y que permitan una sensibilidad cercana al 100%, y una especificidad adecuada que evite laparoscopias innecesarias. La ingeniería biomédica, la tecnología proteómica y el análisis computerizado han permitido identificar proteínas con un papel en la fisiopatología del cáncer de ovario, algunas de las cuales se encuentran actualmente en proceso de validación clínica.

MARCADOR	INDICACIÓN	NACB 2008	NCCN 2013	EGTM 2012	ESMO 2013
CA 125	Cribado en pacientes asintomáticos, sin historia familiar de riesgo	No	No	No	-
	Detección precoz en síndromes hereditarios con ecografía transvaginal	Si	Si	Si	-
	Diagnóstico diferencial de masas pélvicas	Si	Si	Si	-
	Monitorización de terapia	Si	Si	Si	Si
	Detección de recidivas	Si	Si	Si	Si
	Pronóstico	Si	No	Si	-

Tabla 4. Recomendaciones de las guías de práctica clínica sobre el uso de CA 125 en el cáncer epitelial de ovario. Adaptado de: Andrés Fernández C, 2013-2014.

• **Cáncer de próstata**

El cáncer de próstata es uno de los tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo occidental, siendo la quinta causa de muerte por cáncer en varones en todo el mundo. Este cáncer se caracteriza por su elevada prevalencia, aumentando rápidamente su incidencia a partir de los 50 años. Es un tipo de cáncer muy heterogéneo desde un punto de vista clínico ya que incluye tumores con pronósticos muy distintos, desde aquellos clínicamente insignificante a tumores muy agresivos que causan metástasis. El empleo de marcadores tumorales para el manejo de pacientes con cáncer de próstata se remonta a 1938 con el uso de la fosfatasa ácida prostática, sin embargo, su uso cayó con la introducción del PSA.

- **Marcadores tumorales en cáncer de próstata**

El marcador más utilizado para el manejo de este cáncer es el PSA. En condiciones normales solo una fracción mínima de PSA es liberada a la circulación. Debido a su actividad enzimática, circula en plasma unido a proteínas inhibidoras de proteasas, mayoritariamente unido a la alfa-1-antiquimotripsina, solo un porcentaje muy pequeño circula libre y otra fracción circula unida a la alfa-2-macroglobulina.

El PSA es un marcador tumoral ampliamente utilizado ya que está incluido en programas de cribado del cáncer de próstata ofreciéndose a los hombres mayores de 50 años con una expectativa de vida superior a 10 años. En cuanto a las concentraciones de este marcador, se considera 4 ng/mL como valor discriminante a partir del cual habría que realizar una biopsia con el fin de diagnosticar un cáncer de próstata en Atención Primaria. Sin embargo, el corte en pacientes tratados en el Servicio de Urología es de 2,8 ng/mL. Existe una zona gris que va desde los 4 a los 10 ng/mL donde se ha observado que solo el 25% de los pacientes tienen una biopsia positiva. Con el fin de reducir el número de biopsias negativas, se introdujo la utilización del porcentaje de PSA libre de forma que, solo si el porcentaje de PSA libre es menor del 25% del PSA total o el ratio PSA libre/PSA total es menor de 0,1 debe realizarse una biopsia.

La utilización del PSA en el cribado de cáncer de próstata ha permitido la detección de tumores en estadios más tempranos mejorando, en general, el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, su bajo valor predictivo positivo, se traduce en un sobrediagnóstico siendo entre el 27-56% de pacientes diagnosticados de tumores indolentes que no suponen riesgo alguno para su vida. El sobrediagnóstico, produce sobretratamiento de estos pacientes con importantes efectos secundarios como la incontinencia urinaria y disfunción eréctil producidos por la prostatectomía radical. Debido a ello, no hay consenso de las guías de práctica clínica sobre la recomendación del uso de dicho marcador en los programas de cribado que todavía están en proceso de evaluación. La problemática del sobrediagnóstico y sobretratamiento ha impulsado a desarrollar protocolos de vigilancia activa de manera que en pacientes con un tumor con bajo riesgo de progresión se retrasa el tratamiento. Los criterios de selección de pacientes para protocolos de vigilancia activa incluyen diversas variables, entre las cuales se encuentran:

- Concentración de PSA menor a 10 g/L.
- Grado de Gleason menor a 7. Siendo el grado de Gleason un sistema de puntuación que se emplea para medir el grado de agresividad de un cáncer de próstata.
- Un bajo número de cilindros afectados por el tumor.

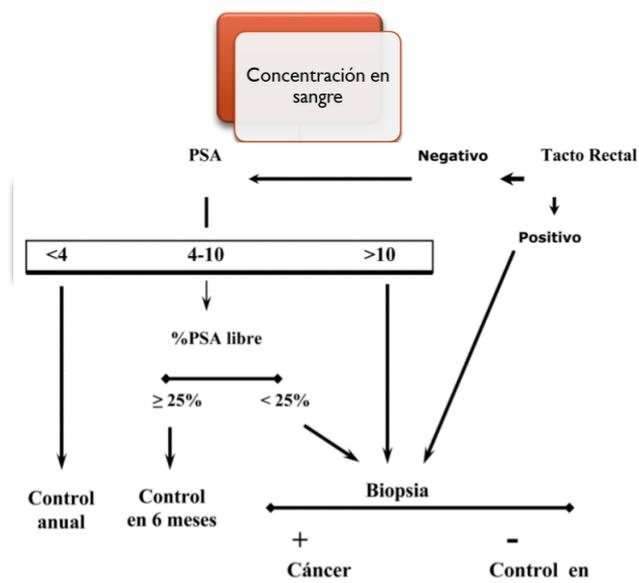


Figura 3. Algoritmo diagnóstico de cáncer de próstata en el programa de cribado. Adaptado de: Filella X, 2011.

Estos protocolos incluyen la realización regular de un tacto rectal y una biopsia de la glándula prostática, así como medidas seriadas de la concentración de PSA en plasma.

En los últimos años, se ha observado que el PSA libre está compuesto por diversas subfracciones denominadas PSA benigno (BPSA), PSA intacto (iPSA) y proPSA, del cual existen distintas subformas, siendo la fracción [-2]proPSA la más estable en plasma.

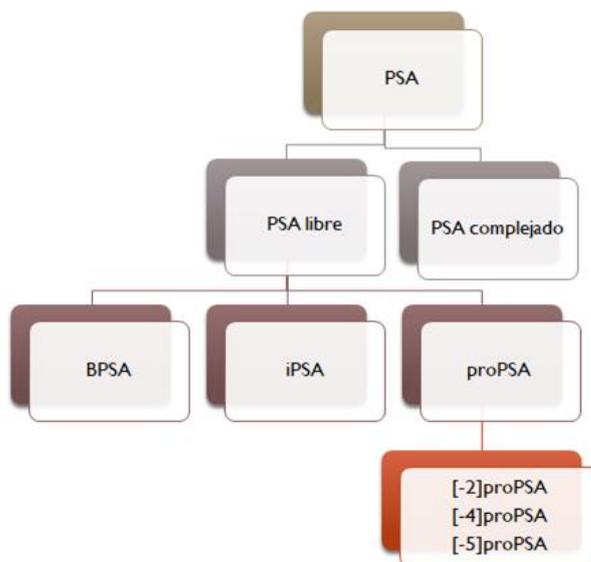


Figura 4. Esquema de las subfracciones de PSA. Elaboración propia.

Se ha desarrollado un índice denominado PHI (*prostate health index*), que valora PSA total, PSA libre y [-2] proPSA. Un PHI superior a 35 se relaciona con una gran probabilidad de cáncer de próstata. También se observaba unanimidad en señalar que hay una relación entre PHI y la agresividad del tumor, detectándose niveles más elevados en pacientes con un grado de Gleason 7 o superior.

Otro nuevo marcador tumoral en el manejo del cáncer de próstata es el panel de 4 calicreínas. Este panel incluye la medida de PSA total, PSA libre, iPSA y la calicreína humana de tipo 2 (hK2). El test, denominado *4Kscore* combina la medición de las 4 calicreínas junto con la edad del paciente, el resultado del tacto rectal y la posible existencia de una biopsia negativa previa. Con todo ello se calcula un índice que estima el riesgo de padecer un cáncer de próstata de alto grado.

En cuanto al diagnóstico molecular se puede mencionar:

- La valoración del gen *PCA3* que fue aprobado en el año 2012 por la FDA con objeto de decidir la repetición de la biopsia de próstata en varones de 50 años o más que tienen una o más biopsias previas negativas.
- La detección en orina del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*.
- La implicación de los miARNs en la detección y pronóstico de diversos tumores, aunque todavía se requiere avanzar más en la optimización y metodología empleada en la medida de los miARNs.

La inmensa mayoría de los estudios disponibles coinciden en concluir que el área bajo la curva obtenida para PHI es significativamente superior a la del PSA total y también discretamente mayor a la obtenida para el porcentaje de PSA libre.

● **Cáncer de mama**

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente entre las mujeres del mundo occidental y es la primera causa de muerte entre las mujeres de 35 a 64 años. En el desarrollo de la enfermedad intervienen numerosos factores de tipo ambiental y genético, siendo uno de los principales factores de riesgo la presencia de cáncer de mama en familiares directos.

La mayoría de tumores son diagnosticados en estadios locales, siendo la cirugía y/o radioterapia seguida o no de tratamiento hormonal, quimioterápico y/o radioterápico el tratamiento de elección.

- **Marcadores tumorales en cáncer de mama**

Los marcadores tumorales séricos más empleados en pacientes con cáncer de mama son los antígenos asociados a la familia de genes *MUC-1* y *CEA*.

- CA 15.3: es el marcador más sensible para esta neoplasia (16-40%) y su concentración se asocia con el tamaño tumoral y la invasión ganglionar. En cuanto a la detección precoz de recidiva, los estudios indican que el CA 15.3 es el marcador tumoral de elección, pero se aconseja la inclusión de CEA ya

que incrementa la detección de recidiva entre un 5 y un 25%.

- CEA: tiene un valor pronóstico superior al CA 15.3, observándose que una mayor concentración de marcador, previa a la cirugía, se relaciona con una mayor probabilidad de recidiva.
- HER-2/neu: *HER-2* es un oncogen localizado en el cromosoma 17 que codifica una proteína transmembrana que pertenece a la familia del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR). Está sobreexpresado en el 15-30% de los carcinomas mamarios y tiene una sensibilidad del 10% en estadio I y de 50% en estadio IV. La proteína codificada por este oncogen, HER-2/neu es una proteína muy específica en suero (niveles normales <15 ng/ml) que rara vez se observa en patología benigna, exceptuando cirrosis o hepatopatías severas. Su determinación se asocia con factores pronósticos del cáncer de mama, así como con la extensión local (ganglios) o a distancia. La determinación sérica tiene interés en el diagnóstico precoz de recidiva y en la monitorización terapéutica, complementando al CEA y CA 15.3. Además, la determinación de este marcador en suero está relacionado con su expresión tisular. El estudio tisular de HER-2/neu (FISH) es de utilidad como factor predictivo de respuesta a tratamientos que inhiben la proliferación de las células que sobre expresan este oncogén.

● **Cáncer de pulmón**

En Europa, representa el 21% de las neoplasias malignas en hombres y el 29% de las muertes por cáncer siendo la supervivencia a los 5 años de tan solo el 13%. La elevada mortalidad se asocia a tres factores: diagnóstico tardío, tipo histológico y edad y estado funcional del paciente que impide en muchas ocasiones la resección radical. Los principales marcadores tumorales utilizados en el seguimiento de cáncer de pulmón son NSE, ProGRP, CEA, SCC y CYFRA 21.1

Existen distintos tipos histológicos de cáncer de pulmón: microcítico (células pequeñas) y no microcítico.

El cáncer de pulmón no microcítico comprende principalmente tres tipos histológicos: adenocarcinoma, carcinoma escamoso y carcinoma indiferenciado de células grandes. Los adenocarcinomas son el tipo histológico más frecuente en mujeres y en individuos no fumadores y el carcinoma escamoso en fumadores. Los MT utilizados en cáncer de pulmón no microcítico son CEA, CYFRA 21-1 y SCC y el CA 125 en menor medida.

El cáncer de pulmón microcítico representa el 25% de las neoplasias pulmonares y es un tumor agresivo, de rápido crecimiento y metastásico, pero sensible a quimioterapia y radioterapia. Es una neoplasia asociada a la diferenciación neuroendocrina, de ahí que se estudie con marcadores como la NSE y el ProGRP.

La especificidad de los marcadores utilizados para el cáncer de pulmón es superior al 90% una vez se han excluido las posibles patologías benignas que pueden elevar dichos marcadores (insuficiencia renal y patología hepática). En

cuanto a la sensibilidad, la combinación de CYFRA, CEA y SCC en no microcítico; y NSE y ProGRP en microcítico permite obtener una sensibilidad del 80% en estadios I-III y del 90% en estudio IV.

- Marcadores tumorales en cáncer de pulmón

- CYFRA 21-1: es el marcador más sensible de carcinoma de pulmón, pero tiene como inconveniente que no es específico para ningún tipo histológico.
- CEA: es el segundo MT más sensible para esta neoplasia y alcanza mayores concentraciones en los adenocarcinomas.
- SCC: es un marcador de menor sensibilidad, pero es más específico ya que su elevación indica casi con certeza un carcinoma no microcítico de tipo escamoso.
- NSE y ProGRP: son más utilizados en el caso de carcinomas microcíticos. La enolasa tiene una sensibilidad que varía según el estadio tumoral y se utiliza en combinación con otros marcadores. El péptido liberador de progastina o ProGRP es un péptido precursor del GRP, un neuropéptido que participa en la señalización celular. Tiene mayor sensibilidad y especificidad que la enolasa y su mayor fuente de falsos positivos se da en la insuficiencia renal. En general niveles superiores a 100 pg/dL en carcinomas de pulmón indican cáncer de pulmón microcítico.

marcadores tumorales claramente relacionados con el tipo histológico y pueden ser considerados como marcadores clave: SCC, ProGRP y NSE. Incrementos séricos de SCC indican carcinoma no microcítico con una probabilidad del 99% (excluyendo insuficiencia renal o enfermedad dermatológica). Mientras que elevaciones de NSE y ProGRP orientan hacia carcinoma microcítico.

La histología es muy importante en el diagnóstico del cáncer de pulmón, ya que tiene implicaciones terapéuticas y pronósticas, pero el diagnóstico no siempre es fácil. Hay tres

	N	CEA >5ng/mL	CYFRA 21-1 >3,3 ng/mL	SCC >2 ng/mL	NSE >25 ng/mL	ProGRP >50 ng/mL
CPM	175	48%	42,9%	0%	65,1%	76,6%
CPNM	ADC	205	69,8%	53,7%	8,3%	8,8%
	ESC	182	42,3%	70,3%	41,2%	13,1%
	CICG	19	26,3%	52,6%	10,5%	15,8%
	TOTAL	406	46,1%	58,8%	20%	12,5%

Tabla 5. Sensibilidad de los MT en pacientes con cáncer de pulmón al diagnóstico. Adaptado de: Molina R, 2010.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Asociación Cris contra el Cáncer. La situación del cáncer en España [Internet]. Madrid: CRIS; 2022. Disponible en: <https://criscancer.org/es/cancerespana2020/#:~:text=S eg%C3%BA n%20el%20informe%20de%20la,en%20los%20C3%BA ltimos%20cinco%20a%C3%B1os.>

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Andrés Fernández C, Peinado Rodenas A, Varo Sánchez GV. Actualización diagnóstica en cáncer de ovario. Programa de formación continuada 2013-2014. Madrid: Asociación Española de Biopatología Médica; 2013.
- Castillo Pérez C, Oana Minea C. El laboratorio clínico en el cáncer de ovario. Uso de los marcadores tumorales.

- Programa de formación continuada 2019-2020. Madrid: Asociación Española de Biopatología Médica; 2019.
- Díez O. Cáncer de mama/ovario hereditario. Genética molecular aplicada al diagnóstico de enfermedades hereditarias 2014-2015. Ed Cont Lab Clin. 2014;21:1-13.
 - Fernández Suárez A, Martínez Peinado A, Gaspar MJ, Filella X, Molina R, Ballesta AM. Marcadores tumorales serológicos. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comisión de Marcadores Biológicos del Cáncer. Clin Chem. 2007;26(2):77-85.
 - Filella X. Estandarización de los marcadores tumorales. Programa de formación continuada 2013. Madrid: Asociación Española de Farmacéuticos Analistas.
 - Filella X. Marcadores tumorales de utilidad en cáncer de próstata. Programa de formación continuada 2011. Madrid: Asociación Española de Farmacéuticos Analistas; 2011.
 - Filella X. Nuevos marcadores en cáncer de próstata. Programa de formación continuada 2019. Asociación Española de Farmacéuticos Analistas. For Cont Lab Clin. 2019;9:1-14.
 - Filella X. Utilidad clínica de los marcadores tumorales. Programa de formación continuada 2010. Madrid: Asociación Española de Farmacéuticos Analistas; 2010.
 - González A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 2ª ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
 - Molina R, Augé JM, Escudero JM, Filella X. Oncoproteína Her-2/Neu en suero: interés clínico en cáncer de mama. Ed Cont Lab Clin.15:68-87.
 - Molina R, Filella X, Augé JM, Escudero JM. Utilidad clínica de los marcadores tumorales. Estado actual y perspectivas de futuro. 3ª ed. Roche Diagnostics; 2011.
 - Molina R. Marcadores tumorales en cáncer de pulmón: teoría y práctica. Abbott Park, IL: Abbott; 2022. http://www.abbottdiagnostics.com/Your_Health/Cancer-Oncology/Lung/default.cfm

GLICOSILACIÓN DE LA TRANSFERRINA: UTILIDAD CLÍNICA DEL PERFIL SÉRICO DE SUS ISOFORMAS

Autores: Steven Abel Merchán Magallanes¹, Elena Ana López Jiménez²

¹Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

²Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos. Hospital Universitario 12 de Octubre

Palabras clave: Glicosilación, Ácidos siálicos, Electroforesis capilar

INTRODUCCION. GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS. TIPOS DE GLICOPROTEÍNAS

Las modificaciones post-traduccionales (MPT) son los cambios químicos que las proteínas pueden sufrir después de su traducción. Se ha estimado que hasta el 80% de todas las proteínas eucariotas presentan algún tipo de MPT. Una de las MPT más relevantes es la glicosilación. Aproximadamente la mitad de las proteínas que se expresan en una célula experimentan esta modificación, que implica la adición covalente de porciones de azúcar a aminoácidos específicos. La glicosilación es la MPT que más contribuye a aumentar la diversidad del proteoma. Casi todos los aspectos de la glicosilación se pueden modificar y presentan amplia heterogeneidad: el enlace glucosídico (el sitio de unión del glicano); la composición, estructura y longitud del glicano.

La glicosilación proteica es el proceso de adición serial de carbohidratos a una proteína. Se trata de un proceso enzimático y de ensamblaje que se realiza en organelas celulares como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi¹. El azúcar primigenio que posteriormente se unirá a la proteína que está siendo traducida en los ribosomas, es sintetizada en el retículo endoplásmico; la glicoproteína podrá entonces modificarse y ensamblarse en el aparato de Golgi, en un proceso denominado maduración.

Durante los procesos que ocurren en la glicosilación de proteínas intervienen dos grupos claves de enzimas conocidas como glucosiltransferasas y glicosidasas.

Las enzimas pertenecientes a la familia de las glucosiltransferasas transfieren un monosacárido desde un

sustrato donante, al que se unen débilmente, hasta un sustrato aceptor mediante el cual se adhieren por un enlace glucosídico fuerte. Según el azúcar transferido, la secuencia que es reconocida en el aceptor (sitio de unión) y el enlace que presenten, estas enzimas se dividen en diferentes grupos (Tabla 1).

Las enzimas que pertenecen a la familia de las glicosidasas rompen el enlace glucosídico entre dos monosacáridos, acortando la cadena que forma el azúcar. Actúan secuencialmente y son específicas del azúcar que eliminan. Al contrario que la anterior familia de enzimas, se generan en concentraciones estables y no originan competencia, produciendo siempre los mismos cortes secuenciales.

PROCESO DE LA GLICOSILACIÓN

• Etapas de la glicosilación:

– N-glicosilación

1. Ensamblaje del intermediario:

El intermediario glucosídico es la base del azúcar que forma parte de glicoproteína, y es la primera molécula que se ensambla en la capa citoplásmica de la membrana del retículo endoplásmico. Este primer intermediario se une a un lípido que es el dolicol pirofosfato, al que se van a unir monosacáridos mediante enlace glucosídico.

2. Proceso de ingreso del intermediario al lumen del RER:

La molécula de dolicol fosfato unida al azúcar, cambia su conformación, girando sobre sí misma, quedando en la cara luminal del retículo.

NOMBRE	AZÚCAR TRANSFERIDO	ORGÁNULO
Manosiltransferasa	Manosa	Retículo endoplasmático
Galactosiltransferasa	Galactosa	Retículo endoplasmático
Glucosiltransferasa	Glucosa	Retículo endoplasmático
Sialiltransferasa	Ácido Siálico	Golgi
Fucosiltransferasa	Fucosa	Golgi
N- acetilgalactominiltransferasa	N-acetil-galactosamina	Golgi
N-acetilglusaminiltransferasa	N-acetil-glucosamina	Citoplasma-retículo-Golgi
N-acetilnemanifiltransferasa	N-acetil-nemarosa	Golgi

Tabla 1. Familia de las glucosiltransferasas. Tomada de: Jong *et al*, 1988.

3. Unión a la proteína:

El intermediario formado se transfiere por una glucosiltransferasa compleja a un residuo de asparragina de la proteína que se está traduciendo, por un enlace N-glicosídico (glicosilación co-traduccional).

4. Modificación en el retículo:

Se activan las glicosidasas que tienen la función de separar los tres últimos residuos de glucosa y la última manosa. La eliminación de estas últimas y la secuencia de tres manosas, que aún permanecen unidas, actúan como señal para iniciar el transporte de la glicoproteína desde el retículo al aparato de Golgi y así terminar su maduración.

5. Modificación postraduccional en el aparato del Golgi:

En los diferentes compartimientos del aparato de Golgi, esta glicoproteína va a sufrir varias modificaciones y plegamientos. Se producen nuevos cortes en el azúcar por medio de glicosidasas y las glucosiltransferasas se encargarán de añadirle nuevos monosacáridos. En el último compartimiento, se va añadir siempre y en todas las proteínas, un ácido siálico a cada extremo de cada una de las ramas del azúcar. Esto se da en todas las glicoproteínas ya que es la señal indicativa del término de la maduración, de la modificación y de transporte fuera de la célula.

– O-glicosilación

Una de las principales diferencias entre la N-glicosilación y la O-glicosilación radica en que en vez de ocurrir una unión por un enlace N-glicosídico, se genera un enlace O-glicosídico; y el lípido transportador del intermediario se halla en la membrana del aparato del Golgi y no en el retículo endoplasmático, por lo que el azúcar se unirá a la proteína una vez finalizada la traducción. A continuación, la proteína sale del aparato de Golgi y se dirige hacia la membrana celular por el sistema de vesículas para ser secretada a su destino.

SISTEMA DE REGULACIÓN EDAM-EDEM DE LAS GLICOPROTEÍNAS

El proceso de glicosilación se encuentra muy regulado bajo las directrices por sistemas EDAM-EDEM. En estos casos en cuanto, se forma la parte de proteica de una glicoproteína en el retículo endoplásmico (RE) se le van a unir el intermediario glucosídico (Figura 1). Y sobre esta estructura antes de viajar al Golgi se van eliminar secuencialmente. Esta eliminación se da cómo una señal para que la glicoproteína ingrese en el sistema Calnexina-Calreticulina de las chaperonas. Formándose un complejo proteico que reduce sustancialmente la posibilidad de formar agregados aberrantes. Este complejo tiene la funcionalidad de revisar el estado de plegamiento de la glicoproteína para determinar si está correcto².

Si no está plegada o formada correctamente, la Glucuroniltransferasa (UGT-1) añade una glucosa obligando a la proteína a resociarse con la calnexina reteniéndola en el RE con el fin que se ensamble correctamente. Si la proteína no se logra reparar, se dirige hacia la vía de degradación asociado al RE (ERAD, también conocido como ERAM), en

el cual, elimina los residuos de manosa de la glicoproteína generando su disociación con la calnexina y su salida del retículo hacia el citosol para ser degradada por los proteasomas³.

Cuando RE está bajo stress, para ayudar el ERAD actúa otro sistema conocido con EDEM, que se encuentra formado por una serie de manosidasas que rompen las manosas de la glicoproteína, acelerando y forzando su entrada en los proteasomas, haciendo que se evite el acúmulo de glicoproteínas mal formadas en el RE, aliviando el stress, manteniendo la capacidad funcional y secretora del RE⁴.

LA TRANSFERRINA COMO REFERENCIA EN LA INVESTIGACIÓN DE LOS DEFECTOS DE GLICOSILACIÓN

La transferrina (Tf) es una glicoproteína que transporta hierro. El gen que codifica para esta proteína se encuentra en el cromosoma 3 en el brazo corto entre 21-25, mide 3,5 kb, 17 exones o zonas codificantes.

La transferrina es una beta-glicoproteína circulante que se sintetiza principalmente en el hígado, aunque también se puede encontrar en menor cantidad en otros tejidos como en glándulas mamarias, nódulos linfáticos e inclusive en células de Sertoli y macrófagos.

Posee un proceso de N-glicosilación de la transferrina es similar al de otras glicoproteínas séricas, por lo que se lleva a cabo sobre residuos de asparragina (Asn). La primera etapa inicia en el retículo endoplásmico y la termina en el aparato de Golgi, con la intervención de un portador lipídico llamado dolicol, sobre el que se sintetiza un oligosacárido precursor que contiene nueve residuos de manosa (Man), tres residuos de glucosa (Glc) y dos residuos de N-acetil glucosamina (GlcNAc)⁵.

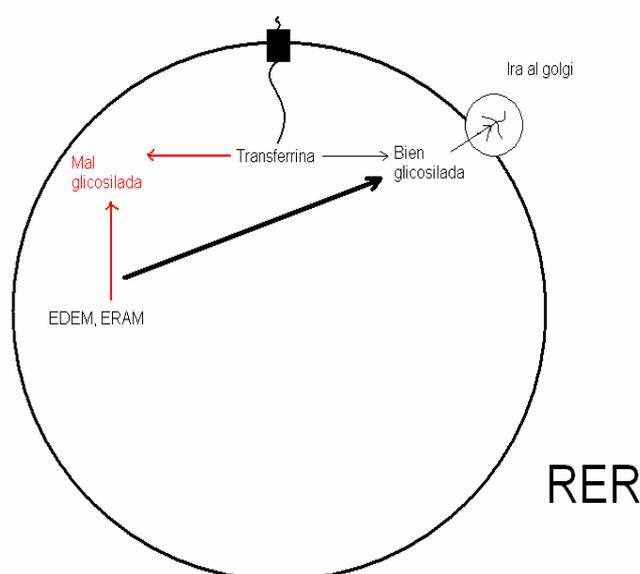


Figura 2. Glicosilación en célula normal, la transferrina puede glicosilarse mal, pero el sistema EDEM y ERAM consiguen corregir o eliminar toda la transferrina mal glicosilada.

Tomada de: Garrido-Allepuz, 2008.

GLICOSILACIÓN E ISOFORMAS DE LA TRANSFERRINA

El proceso de ensamblaje debe ser correcto en la glicosilación para que la proteína presente una funcionalidad adecuada y además el hierro para pueda unirse a la transferrina, puesto que, las cadenas de azúcares de cada lado se van a plegar para formar los puntos de unión al hierro. Las cadenas pueden contener de 0 a 8 residuos de ácidos siálico que da origen a la heterogeneidad de la molécula de la transferrina, generando así a las diferentes isoformas con variaciones en su punto isoeléctrico de 0,1 unidades por cada residuo de ácido siálico⁶.

A nivel de torrente sanguíneo la isoforma más abundante de la transferrina es la que posee 4 residuos de ácido siálico, conocida como tetrasialotransferrina. A medida que la proteína envejece, los residuos de ácidos siálicos, se desprenden por el debilitamiento de los enlaces. En el momento que la transferrina queda limitada a tres ácidos siálicos, llamada trisialotransferrina, es captada por receptores en los hepatocitos, se internaliza y es destruida y reciclada. La isoforma pentasializada de la transferrina se sabe que se produce al añadirse por error un quinto residuo de ácido siálico al final del proceso de maduración, pero no interfiere en la función de esta glicoproteína por el cual no es degradada por los sistemas de corrección, esta isoforma carece de significado clínico o patológico conocido. Y finalmente debido al envejecimiento de la proteína o por alteraciones metabólicas pueden producirse otras isoformas debido a la pérdida de residuos de ácido siálico: disialotransferrina, monosialotransferrina y asialotransferrina con dos, uno y ningún residuo de ácido siálico respectivamente (Figura 2).

INTERÉS CLÍNICO DE LA GLICOSILACIÓN Y SUS DEFECTOS

Se han descrito algunos tipos de patologías ya asociadas hoy en día que se utilizan de gran importancia clínica:

- **Detección de pérdidas de LCR**

Más del 80% de los casos de rinorrea y otorrea de LCR resultan de lesiones traumáticas en la cabeza, y el resto por causas no traumáticas como tumores, defectos congénitos o infecciones. La detección temprana de la pérdida de LCR puede prevenir complicaciones neurológicas⁷.

Se debería sospechar la presencia de fístulas en pacientes que presentan secreciones nasales o en el oído (intermitentes o permanentes), similares al agua, que pueden ser confundidos con rinitis u otitis.

El LCR llena el espacio subaracnoideo bañando el cerebro y la médula espinal. Si las membranas que rodean el sistema nervioso central (SNC) están dañadas, el LCR puede escaparse del espacio subaracnoideo a través de la nariz o del oído:

La rinorrea por pérdida nasal de LCR, puede deberse a una fístula entre el espacio subaracnoideo y la cavidad nasal o entre el espacio subaracnoideo y el oído medio o cavidad mastoidea.

Los pacientes con rinorrea pueden adquirir una infección que, a través de la fístula, se transmita al espacio

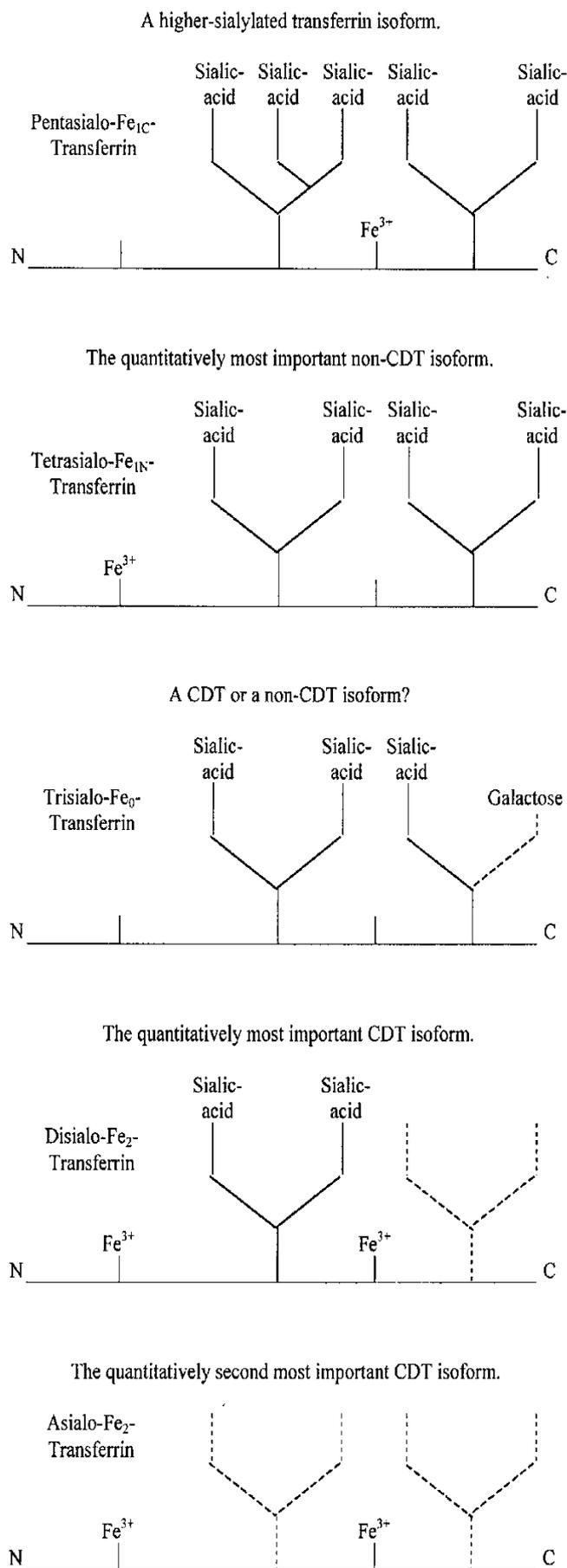


Figura 2. Microheterogeneidad de transferrina sérica humana atribuible al diferente grado de sialilación de las cadenas de N-oligosacáridos. Tomado de: Arndt, 2001.

subaracnoideo dando lugar a graves meningitis recurrentes y/o encefalitis.

La otorrea u otorraquia por secreción o pérdida de LCR dentro del oído medio, indicaría una comunicación entre el oído medio y el espacio subaracnoideo. El riesgo de padecer una otorrea de este tipo consiste en sufrir episodios de otitis media seguidos de meningitis recurrentes con pérdida de audición.

- **Hepatopatías relacionadas al alcoholismo**

La presencia de un daño hepático produce la aparición de las isoformas hipoglicosiladas e la transferrina o con déficit de ácido siálico, formas de transferrina deficiente en ácido siálico: CDT, asialotransferrina, monosialotransferrina y disialotransferrina en suero⁸.

Esta CDT mide el efecto de dicho daño, tomando en cuenta que tiene una vida media de 15 días. Las Hepatopatías ligadas a la ingesta del alcohol, la CDT mide el efecto acumulado de este consumo, que se puede manifestar tras la ingesta regular de 59 a 80 g. de etanol durante el día, o al menos, una semana normalizándose tras 15 días de abstinencia⁹.

- **Síndrome de glicoproteínas deficientes en carbohidratos**

Es un síndrome multisistémico con una herencia autosómica recesiva. Se caracteriza clínicamente por retraso psicomotriz y mental, neuropatía periférica, hepatopatía temprana, nefropatía, anomalías en la coagulación y tejidos cardíaco, adiposo, piel y esqueleto.

Desde el punto de vista bioquímico, el síndrome de glicoproteínas deficientes en carbohidratos (SGDC), afecta con mayor intensidad a la Transferrina que a otras glicoproteínas, lo que conduce a valores extremadamente altos de TDC en todos los pacientes. También, está incrementado en el 25% de los portadores sanos (heterocigotos)¹⁰.

Teniendo en cuenta la clínica y los patrones electroforéticos de la TDC se han descrito cinco tipos de SGDC:

- Tipo Ia y Ib

Ambos poseen el mismo patrón caracterizado por dos bandas anormales, que corresponden a las isoformas disialotransferrina y la asialotransferrina. En estas moléculas se produce la pérdida completa de la cadena glucídica y no sólo del ácido siálico. Se diferencian por el enzima deficitario; el tipo Ia es deficiente en fosfomanomutasa (PMN) y el tipo Ib en fosfomanosa isomerasa (PMI). Hay que señalar que pacientes alcohólicos y portadores de galactosemia sin tratar pueden presentar un patrón similar.

- Tipo II

La banda tetrasialotransferrina es sustituida por una banda ancha de disialotransferrina. Aquí no se produce la pérdida total de la cadena glucídica sino del ácido siálico y de los dos primeros glúcidos. Se caracteriza por un déficit de N-acetilglucosaminiltransferasa II. No obstante, la intolerancia hereditaria a la fructosa puede dar un patrón de transferrina indistinguible de los SGDC tipo II.

- Tipo III

En el patrón electroforético se observa un ligero aumento de las fracciones tri-, di-, mono- y asialotransferrina.

- Tipo IV

No se observa la banda de asialotransferrina característica del tipo I.

- **Gestación y Preeclampsia**

El embarazo provoca importantes adaptaciones en la fisiología y el metabolismo maternos. Durante el progreso de la gestación, los niveles de concentración de numerosos parámetros bioquímicos divergen radicalmente de los encontrados en mujeres no embarazadas. Además de los cambios hormonales bien establecidos, también se ven influidas muchas proteínas plasmáticas; por ejemplo, las concentraciones de albúmina disminuyen con la gestación. La concentración de la proteína transportadora de hierro transferrina aumenta durante el embarazo, y esto se acompaña de un cambio en la microheterogeneidad de la transferrina¹¹. Durante el embarazo, hay un cambio hacia una mayor proporción de glucanos altamente ramificados y altamente sialilados. La importancia fisiológica de este fenómeno no está clara, pero se ha propuesto que facilita el suministro de hierro a la placenta para asegurar un suministro adecuado para el crecimiento fetal¹².

Uno de los mecanismos principales en la patogenia de la preeclampsia es el de la insuficiencia placentaria debida a una remodelación deficiente de la vasculatura materna de perfusión en el espacio intervelloso. En un embarazo normal, el citotrofoblasto fetal invade las arterias uterinas espirales maternas reemplazando el endotelio, y las células se diferencian en citotrofoblastos endotelioideos¹³.

En la paciente predestinada a desarrollar preeclampsia, dichos defectos en este proceso de transformación vascular aún no del todo comprendidos conducen a una entrega inadecuada de sangre a la unidad útero-placentaria en desarrollo e incrementa el grado de hipoxemia y estrés oxidativo en retículo endoplásmico a nivel celular¹⁴.

BIBLIOGRAFIA ESPECIFICA

1. De Jong G, Van Eijk H. Micro heterogeneity of human serum transferrin. *Electrophoresis*. 1988;9:589-98.
2. Olivari S, Cali T, Salo K. EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;49:1278-84.
3. Eriksson K, Vago R, Calanca V, Galli C. EDEM contributes to maintenance of protein folding efficiency and secretory capacity. *J Biol Chem*. 2004;43(279):44600-5.
4. Deschamps E, Miña A, Diéguez M. Isoformas de la transferrina: Utilidad clínica de su determinación. *Rev Diagn Biol*. 2003;7973-4.

5. Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem.* 1997;37:2029-37.
6. Henry H, Froelich F, Perret R. Microheterogeneidad of serum glycoproteins in patients with chronic alcohol abuse compared with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I. *Clin Chem.* 1999;45:1408-13.
7. Oberascher G. A modern concept of cerebrospinal fluid diagnosis in oto- and rhinorrhea. *Rhinology.* 1988;26:89-103.
8. Story E, Anderson G. Desialylated transferrin as a serological marker of chronic excessive alcohol ingestion. *Lancet.* 1987;6:1292-3.
9. Jeppson J, Aguzzi F. Serum proteins "Transferrin". *Clin Med.* 1996;1:2-20.
10. Arndt A. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: critical review of preanalysis, analysis and interpretation. *Clin Chem.* 2001;47:13-47.
11. Leger D, Campion B, Decottignies J, Montreuil J, Spik G. Physiological significance of the marked increased branching of the glycans of human serotransferrin during pregnancy. *Biochem J.* 1989;25:231-8.
12. Wu Y, Sakamoto H, Kanenishi k, Tanaka S, Ueno M, Hata T. Transferrin microheterogeneity in fetal blood. *Biol Neonate.* 2004;86:98-103.
13. Cook J. Biochemical markers of alcohol use in pregnant women. *Clin BioChem.* 2003;36(1):9-19.
14. Hung T, Burton G. Hypoxian and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwan J Obstret Gynecol.* 2006;45:186-200.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Garrido-Allepuz Herrera C. Alteraciones de la glicosilación de la transferrina. Estudio de su utilidad clínica como marcador de disfunción metabólica [Tesis doctoral]. Santander: Universidad de Cantabria; 2008. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=181671>

USO DE LA BETA2-TRANSFERRINA Y OTROS MARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO DE FÍSTULAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Autores: Esther Carolina Tamayo Hernández; David Melero López

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

Palabras clave: Fístula, Rinorrea, Beta2-transferrina

INTRODUCCIÓN

Se entiende por rinorrea la descarga de una secreción mucosa, serosa o purulenta por las narinas o coanas. Un caso particular de rinorrea es la rinorrea, una condición debida a la existencia de una fístula o comunicación entre el espacio subaracnoideo y la cavidad nasal que se traduce en la salida del líquido cefalorraquídeo (LCR) por la nariz. Aunque la rinorrea es más frecuente por la fragilidad del hueso etmoides, también puede producirse comunicación con la cavidad auditiva, en cuyo caso hablamos de otorrea.

Así, la fístula de LCR es una entidad clínica de vital importancia, pues las cavidades nasal y auditiva cuentan con una flora bacteriana que eventualmente podría penetrar por la fístula produciendo infecciones. De acuerdo con Morales C., el 80% de los pacientes portadores de fístulas de LCR terminan por presentar un cuadro de meningitis bacteriana¹, siendo más frecuente en aquellas debidas a un traumatismo. Además de la citada causa traumática, este espacio puede ser consecuencia de:

- Complicaciones quirúrgicas del seno nasal.
- Ciertos defectos congénitos.
- Apnea del sueño que genera un aumento de la presión intracraneal (PIC) y recibe el nombre de rinorrea espontánea del LCR.

GENERALIDADES DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El líquido cefalorraquídeo es una solución compleja que rodea el encéfalo y la médula espinal y se sintetiza principalmente en los plexos coroideos, aunque cierta parte tiene su origen en las células endoteliales que revisten las superficies de los ventrículos cerebrales.

Mantener un adecuado volumen de líquido cefalorraquídeo resulta fundamental debido a su función amortiguadora, oscilando éste entre 90 y 150 ml en adultos mientras que en neonatos varía en un rango de 10 a 60 ml. Además de amortiguar posibles traumatismos, proporciona estabilidad mecánica y sostén al encéfalo, contiene sustancias nutritivas y elimina desechos derivados del metabolismo del Sistema Nervioso Central (SNC).

En lo que respecta a su apariencia, el líquido cefalorraquídeo normal es transparente, cristalino ("agua de roca"). A nivel bioquímico, los principales parámetros de interés son las proteínas, el lactato y la glucosa. En la Tabla 1 se especifican los valores de referencia del líquido cefalorraquídeo en nuestro hospital.

Analito	Unidades	Rango de referencia
Proteínas	g/L	0.15-0.45
Lactato	mmol/L	1.1-2.4
Glucosa	mg/dL	40-70

Tabla 1. Valores de referencia de proteínas, lactato y glucosa en LCR. Elaboración propia.

El 80% de esas proteínas proviene del plasma, llegando al SNC por difusión pasiva a favor del gradiente principalmente. Así, que una proteína atraviese la barrera hematoencefálica desde la sangre al LCR va a depender de varios factores:

- Constantes fisicoquímicas: Masa molar, carga eléctrica.
- Concentración en el plasma.
- Estado funcional de la barrera hematoencefálica.

El 20% restante de las proteínas del líquido cefalorraquídeo se originan por síntesis intratecal.

Por su parte, el ácido láctico tiene utilidad como marcador de hipoxia y para el diagnóstico diferencial de meningitis bacteriana o no bacteriana. Finalmente, el tercer parámetro bioquímico, la glucosa, debido a su tradicional empleo como marcador de LCR se analizará con detenimiento a lo largo del presente capítulo.

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Ante la sospecha de rinorrea es necesaria una correcta anamnesis y un examen físico completo del paciente. Los pacientes con fístula activa suelen presentar cefalea, anosmia y vértigo, aunque el signo más característico de esta patología es el llamado "signo del reservorio", que consiste en la salida de líquido por las narinas al mover la cabeza.

El principal objetivo diagnóstico es, en cualquier caso, confirmar que realmente se trata de líquido cefalorraquídeo o si, por el contrario, la secreción tiene otro origen. Para ello, los clínicos cuentan con pruebas de imagen, dinámicas y de laboratorio. En las de imagen destacan el TAC y la resonancia magnética. Con el TAC se valora el componente óseo mientras que la resonancia permite ver el estado de la fístula y el parénquima. El principal estudio dinámico es la cisternografía, en la que mediante una punción lumbar, se inyecta material radiactivo en la columna del paciente que permite ver si el líquido se está filtrando hacia el exterior.

En la mayoría de los casos, estos estudios no permiten el diagnóstico definitivo, siendo las pruebas de laboratorio las que finalmente confirman el diagnóstico de rinoorraquia. Tradicionalmente se ha usado la glucosa como criterio orientativo hacia líquido cefalorraquídeo, por el hecho de que las secreciones nasales no contienen glucosa y el líquido cefalorraquídeo, al ser un ultrafiltrado del plasma, sí. No obstante, la determinación de glucosa en sí misma no permite el diagnóstico de rinoorraquia, pues en aquellos casos en que la secreción se contamina con sangre pueden producirse falsos positivos.

Dado que no existe un algoritmo diagnóstico claro y que en muchos centros no se cuenta con el equipamiento necesario para confirmar la pérdida de líquido cefalorraquídeo, en muchas ocasiones se sigue recurriendo a cirugía para tratar de hallar el defecto, con los riesgos que ello conlleva. Es por ello que resulta fundamental hacer una revisión de los principales marcadores de líquido cefalorraquídeo con los que se cuenta en la actualidad.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Los tres pilares en los que se sustenta el diagnóstico de laboratorio en casos de rinoorraquia son la glucosa, la beta traza y la beta2-transferrina.

• Glucosa

La glucosa presente en el líquido cefalorraquídeo llega a través de la barrera hematoencefálica por difusión facilitada y transporte activo. Es por ello que su concentración en LCR va a depender directamente de su concentración en plasma. Así, un aumento de concentración de glucosa en plasma, como ocurre en pacientes diabéticos, podría encubrir una disminución de la glucosa en líquido cefalorraquídeo. Del mismo modo, encontrar glucosa disminuida en el líquido de un individuo hipoglucémico podría ser únicamente un efecto de la baja concentración plasmática de la misma y no un rango alterado en el líquido de interés. Otra interferencia común se da tras punciones traumáticas donde la contaminación con sangre eleva la glucosa en el líquido.

La concentración de glucosa en el líquido problema se mide por medio de tiras multirreactivas que se basan en la reacción enzimática específica de la glucosa oxidasa. Esta enzima genera peróxido de hidrógeno que oxida a un cromóforo en presencia de peroxidasa, generándose un compuesto coloreado. En condiciones normales tanto de flujo de glucosa por la barrera hematoencefálica como de consumo habitual de la misma, su concentración es aproximadamente dos tercios de la concentración en sangre periférica.

Un estudio reveló la detección de glucosa como criterio diagnóstico indicativo de rinoorraquia presenta una sensibilidad del 57%, una especificidad del 88%, un VPP de 81%, un VPN de 69.5% y una precisión diagnóstica del 73%, estableciéndose las pruebas de imagen o la inyección intratecal como métodos diagnósticos de referencia en la identificación de la fístula². Es por ello que es necesario explorar otras pruebas de laboratorio que permitan el establecimiento de un diagnóstico de confianza.

• Beta traza

La prostaglandina D sintasa de tipo lipocalina es responsable de la biosíntesis de prostaglandina D2 en el sistema nervioso central y los órganos genitales, secretándose en el líquido cefalorraquídeo y plasma seminal como beta traza. Es la proteína más abundante en LCR tras la albúmina.

Se trata de un miembro de la familia de las lipocalinas, una familia compuesta por varias sustancias que comparten una estructura común definida por la unión de ligandos lipofílicos. Además de intervenir en la contracción y relajación del músculo liso, actúa como neuromodulador y marcador trófico en el SNC. Su interés clínico radica en que es el principal polipéptido constituyente del líquido cefalorraquídeo.

La beta traza fue introducida por Felgenhauer como marcador de líquido cefalorraquídeo debido a que su concentración normal es 35 veces mayor que en el suero y además no se encuentra en lágrimas y en secreciones nasales. De ahí se deduce su utilidad como marcador de líquido cefalorraquídeo.

No obstante, se dan dos contextos clínicos en los cuales los niveles de beta traza pueden verse alterados; por un lado, el aumento de su concentración en pacientes con alteraciones renales tal como establece Priem³ en el año 1999 y, por otro, la disminución de su concentración en pacientes con meningitis bacteriana de acuerdo con la revisión de Dorta-Contreras⁴ en 1998. En el estudio realizado por Meco⁵ en 2003, los pacientes con una reducción de la filtración glomerular presentaban una concentración de beta traza al menos 25 veces más elevada en suero y 7 veces más elevada en líquido cefalorraquídeo que los pacientes sanos. Sin embargo, en los pacientes con meningitis bacteriana la concentración de beta traza se encontraba cinco veces más reducida. Por ese motivo, es fundamental interpretar los datos de laboratorio siempre teniendo presente el contexto fisiopatológico y la historia clínica del paciente.

En lo que respecta a su detección cabe destacar el método nefelométrico, que se basa en el empleo de partículas de poliestireno cubiertas con anticuerpos antiproteína humana. Se requiere un mínimo de 150 microlitros de muestra y se pueden llegar a aceptar diluciones a 1:5 de líquido cefalorraquídeo. Las principales ventajas de esta técnica son su rapidez y la automatización del proceso. Sin embargo, al tratarse de una técnica cuantitativa, es controvertido el establecimiento del corte a partir del cual la concentración de beta traza es indicativa de líquido cefalorraquídeo.

Petereit⁶ establece que su sensibilidad y especificidad por nefelometría, al compararla con el método de referencia (electroinmunoensayo), es del 92% y 100%.

• Beta2-Transferrina

Para comprender la utilidad de la beta2-transferrina como marcador de líquido cefalorraquídeo es preciso hacer un breve recorrido por las principales características de las fracciones proteicas, tanto de suero como de líquido cefalorraquídeo.

Las proteínas son moléculas anfóteras: su carga neta depende del pH del medio. Generalmente la separación de proteínas se hace en medio básico, donde la mayoría

adquieren carga negativa. Es por ello que cada proteína va a migrar hacia el ánodo o polo positivo en función de su carga y tamaño: a mayor carga y menor tamaño, mayor migración.

Cuando sometemos el suero a un campo eléctrico, encontramos la albúmina como banda más anódica y marcada, al ser la proteína de menor tamaño y más abundante, pues supone aproximadamente el 50% del total de proteínas plasmáticas (Figura 1). La fracción globulina, a su vez, está compuesta de globulinas α_1 , α_2 , β , y γ . Estas fracciones pueden evidenciarse usando electroforesis de proteínas, obteniéndose las siguientes bandas y proporciones relativas, de acuerdo a los valores de referencia utilizados en nuestro hospital (Tabla 2).

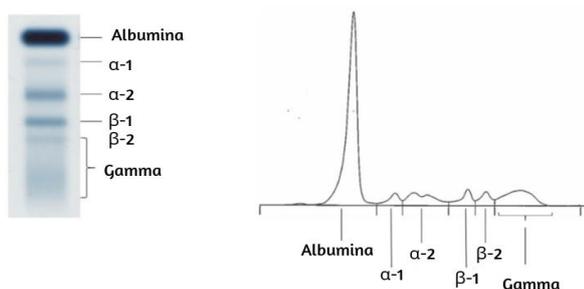


Figura 1. Electroforesis de proteínas en suero. Tomado de: La Rosa C, 2021.

De esta manera, la fracción proteica del suero presenta las siguientes bandas:

- Banda de albúmina.
- Banda de α_1 -globulinas: que incluye α_1 -antitripsina, α_1 -glicoproteína ácida, α_1 -lipoproteína, transcortina y α_1 -fetoproteína.
- Banda de α_2 -globulinas: formada por α_2 -macroglobulina, ceruloplasmina y α_2 -haptoglobina.
- Banda de β_1 -globulinas: formada por transferrina y hemopexina.
- Banda de β_2 -globulinas: que incluye β_2 -microglobulina y las proteínas del complemento C3, C4.
- Banda de Y-globulinas: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

Por otro lado, cuando se somete el líquido cefalorraquídeo a un campo eléctrico vamos a encontrar un proteinograma similar al de suero pero con algunas diferencias que, en el

Fracción proteica	Porcentaje relativo (%)
Albúmina	50-60
α_1	4-8
α_2	8-10
$\beta_1 + \beta_2$	10-15
γ	15-20

Tabla 2. Fracciones proteicas del suero y sus porcentajes relativos. Elaboración propia.

caso de la revisión que nos compete, pueden resultar muy útiles de cara a poder identificar como cefalorraquídeo un líquido de origen incierto.

En primer lugar, la electroforesis de líquido cefalorraquídeo se caracteriza por una disminución en la riqueza de las bandas de precipitación. Asimismo, hay una mayor frecuencia de aparición e intensidad de la banda de prealbúmina que en el caso del suero. La región α_1 es bastante similar al suero, pero en la α_2 , sin embargo, la pobreza en las líneas se va a hacer más evidente y es debido a que en la electroforesis de LCR no se aprecia escalonamiento en esta zona de las tres líneas correspondientes a α_2 -macroglobulina, ceruloplasmina y haptoglobina, ya que no aparece la línea de la α_2 -macroglobulina y las otras dos aparecen muy débilmente. En la región γ se observa la banda de precipitación de la IgG.

Sin embargo, la diferencia más notable entre ambos proteinogramas radica en la región β , donde se hace muy notable el doble trazo de la transferrina correspondiente a la alta concentración de la isoforma de transferrina con movilidad β_2 que existe en líquido cefalorraquídeo (banda 6, Figura 2), donde además la concentración de proteínas del complemento es baja.

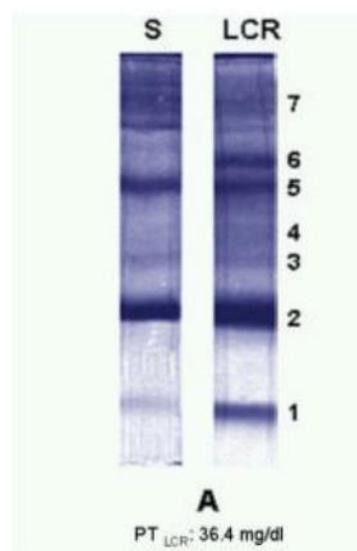


Figura 2. Diferencias en la electroforesis de suero y líquido cefalorraquídeo. Adaptado de: Dorta-Contreras A *et al*, 2009.

ISOFORMAS DE LA TRANSFERRINA

Como se ha visto en el apartado anterior, la principal diferencia entre el proteinograma en suero y en líquido cefalorraquídeo corresponde a la doble banda de migración de la transferrina que, cuando atraviesa la barrera hematoencefálica, pierde los residuos de siálico adquiriendo una movilidad distinta a la que presenta en suero.

La transferrina es una glicoproteína transportadora de hierro (Fe^{3+}) sintetizada y metabolizada en los hepatocitos. Consta de una única cadena polipeptídica con 679 aminoácidos y de dos lóbulos con estructura similar e independientes para fijar el ion férrico. Presenta, asimismo, dos cadenas complejas

enlazadas a los residuos de asparagina en las posiciones 413 y 611 del dominio C-terminal por N-glicosilación. Estas dos cadenas de oligosacáridos varían en su grado de ramificación, pudiendo presentar cada una de ellas entre dos y tres cadenas externas o antenas con un residuo de siálico en posición terminal. Es, precisamente, el número de residuos de siálico lo que determina las diferentes isoformas de la transferrina y, por tanto, también su distinta movilidad.

- **Transferrina tetrasializada**

Es la isoforma de transferrina mayoritaria tanto en suero como en líquido cefalorraquídeo, cuenta con cuatro residuos de siálico y migra en la región $\beta 1$.

- **Disialotransferrina**

Se trata de una forma atípica presente en hepatopatías alcohólicas. El alcohol altera la actividad de la enzima sialil-transferasa, responsable de la adición de ácido N-acetil neuramínico a la transferrina, lo que deriva en la formación de una transferrina con dos residuos de siálico. Esta isoforma adquiere una movilidad intermedia entre $\beta 1$ y $\beta 2$ que puede llevar a interpretaciones erróneas. Es por ello que se recomienda siempre procesar simultáneamente el líquido a identificar junto con suero del mismo paciente.

- **Transferrina desializada**

También llamada proteína tau o $\beta 2$ -transferrina. La transferrina tau es una forma de transferrina desializada presente en líquido cefalorraquídeo que se forma por:

- Acción de una neuroaminidasa del SNC: se produce la internalización de la proteína mediante receptores para la transferrina nativa situados en las células endoteliales de los capilares cerebrales, con la consiguiente desialización de la misma y su posterior liberación al espacio extracelular.
- Síntesis intratecal: se ha aislado ARNm que codifica para transferrina en células del epitelio coroideo.

La transferrina con movilidad tau o desializada supone entre un 15 y un 20% del total de la transferrina en líquido cefalorraquídeo, pues aún en líquido cefalorraquídeo la isoforma nativa con movilidad $\beta 1$ sigue siendo la más abundante.

DETECCIÓN DE LA BETA2-TRANSFERRINA EN EL LABORATORIO

Las dos formas de transferrina se separan muy bien en la electroforesis, apareciendo más anódicamente la nativa ($\beta 1$ transferrina) y más catódicamente la transferrina- τ ($\beta 2$ transferrina), por la pérdida de residuos de ácido siálico. Puesto que la transferrina- τ se forma por acción de la neuraminidasa en el SNC, la presencia de $\beta 2$ -transferrina permite la identificación del líquido problema como líquido cefalorraquídeo.

Primero se lleva a cabo la separación electroforética de las proteínas someténdolas a un campo eléctrico, con la consiguiente migración de estas hacia el ánodo. Después, se procede a su fijación y revelado para identificar su presencia y separación. Finalmente, se cuantifican las fracciones electroforéticas mediante fotómetros especiales o

densitómetros, que van a cuantificar el colorante fijado a diferentes distancias del punto de aplicación y así representar gráficamente la separación.

Para la detección de tau en el laboratorio puede utilizar el kit HYDRAGEL 6 $\beta 2$ TRANSFERRIN(E) de Sebia®. Este test está pensado para la separación electroforética de las tres isoformas de $\beta 2$ -transferrina: sializada, parcialmente sializada y desializada. Tras la separación, se inmunofija un anticuerpo anti-transferrina humana marcado con peroxidasa que reacciona con todas las isoformas de la proteína. Este equipo permite detectar la $\beta 2$ -transferrina hasta una concentración de 80 a 100 $\mu\text{g/L}$.

La interpretación de la electroforesis se efectúa en dos pasos; un análisis cualitativo, en el que se observa si el líquido problema presenta una banda en la zona de migración de la $\beta 2$ -transferrina y, en caso de que fuera necesario, un análisis cuantitativo mediante lectura densitométrica.

- **Análisis cualitativo:**

El análisis visual de la electroforesis permite confirmar la presencia de proteína tau en el líquido problema, siendo positiva una muestra cuando la fracción correspondiente a la transferrina desializada (0-sialo) es más intensa que la fracción sializada (2-sialo).

- **Análisis cuantitativo:**

El análisis cuantitativo (Tabla 3) determina la proporción de 0-sialo respecto a la 2-sialo que existe en el líquido problema. En cualquier caso, una muestra va a ser positiva cuando el cociente 0-sialo/2-sialo del líquido problema sea superior a 1.

Si, por el contrario, el cociente es inferior o igual a 1 es recomendable analizar nuevamente el suero del mismo paciente para así comparar el cociente 0-sialo/2-sialo del suero con el del líquido problema. En este caso:

- Si el cociente 0-sialo/2-sialo del suero es mayor o igual que el cociente 0-sialo/2-sialo del líquido problema, la transferrina desializada proviene del plasma y, por tanto, el resultado es negativo.
- Si el cociente 0-sialo/2-sialo del suero es inferior al cociente 0-sialo/2-sialo del líquido de secreción, una parte de la transferrina desializada procede del LCR y, por ende, el resultado es positivo.

VALOR DIAGNÓSTICO DE LA BETA2-TRANSFERRINA

McCudden⁸ estudió 63 muestras de pacientes con diagnóstico de fístula de LCR y las compararon con muestras de pacientes sanos para así valorar la sensibilidad y especificidad de la beta2-transferrina. Encuentran una sensibilidad del 100% y una especificidad del 71%.

Cociente	Líquido de secreción	Suero	Conclusión
0-sialo/2-sialo	>1	Análisis no necesario	Positivo
0-sialo/2-sialo	≤1	0-sialo/2-sialo del suero ≥ 0-sialo/2-sialo del líquido de secreción	Negativo, contaminación del plasma
		0-sialo/2-sialo del suero < 0-sialo/2-sialo del líquido de secreción	Positivo, una parte de 0-sialo proviene del LCR

Tabla 3. Interpretación de los resultados de la densitometría en beta2-transferina. Adaptado de: Sebia Hispania S.A, 2021.

Warnecke⁹ y sus colegas analizaron la presencia de beta2-transferina en 182 pacientes con sospecha de fístula de LCR. De esos 182 pacientes, 35 fueron positivos en beta2-transferina y 34 de estos pacientes fueron finalmente diagnosticados de fístula de líquido cefalorraquídeo valiéndose de la historia clínica, cisternografía con radionúclidos y visualización intraoperatoria como pruebas para el diagnóstico definitivo. Estos resultados exhiben una sensibilidad y especificidad del 97% y 99%, junto con un VPP y VPN del 97% y 99%.

Una de las principales ventajas que presenta esta técnica, es que la proteína se mantiene estable fuera del organismo, refrigerada a 4°C, por más de 5 días, por lo que tanto su obtención como el posterior análisis podrían demorarse en aquellos casos que haya dificultad para acceder a la técnica o sea haya que remitir la muestra a un laboratorio de otro centro. Este hecho es muy importante, pues un resultado negativo no podría atribuirse a una degradación de la proteína por demora en el procesamiento de la muestra.

En lo que respecta a las desventajas, el tiempo de procesamiento es superior a 2 horas y se requiere personal cualificado tanto para la realización de la técnica como para la posterior interpretación de los resultados.

CONCLUSIONES

Como se ha visto a lo largo del presente capítulo, tanto la beta traza como la beta2-transferina son dos marcadores cuya elevada sensibilidad y especificidad hacen de ellos herramientas útiles y precisas a la hora de establecer el diagnóstico definitivo de fístula de líquido cefalorraquídeo. El hecho de decantarse por la realización de un método o de otro va a depender de las capacidades y necesidades del centro en cuestión, siendo ambas pruebas válidas para el objetivo que nos compete. No es así en el caso de la detección de glucosa por medio de tiras multirreactivas, pues su baja precisión diagnóstica no permite asumir un diagnóstico con garantías, aunque es válida como herramienta de cribado por su rapidez, accesibilidad y bajo coste.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

- Morales C, Osorio J, Cantero D. Fístula de líquido cefalorraquídeo del receso lateral de seno esfenoidal.

- ¿Es el canal de Sternberg un defecto real? Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello. 2017; 77(4):449-55.
- García FJ, Talamantes F, Redondo J, Quilis B, Perez T, Goloney V. Precisión diagnóstica de las tiras multirreactivas de glucosa y nefelometría para beta-2-transferina en la confirmación de rinoliquorrea. An Orl Mex. 2016;61(2):100-9.
- Priem F, Althaus H, Birnbaum M, Sinha P, Conradt HS, Jun, K. β -Trace Protein in Serum: A New Marker of Glomerular Filtration Rate in the Creatinine-Blind Range. Clin Chem. 1999;45(4):567-8.
- Dorta-Contreras AJ, Reiber, H, Aguero-Valdes E, Interian-Morales MT, Mechulam-Cohen A, Noris-Garcia E (1998). Beta trace protein in the cerebrospinal fluid and serum in meningoencephalitis. Rev Neurol. 1998;26(151):386-8.
- Meco C, Oberascher G, Arrer E, Moser G, Albegger K. Beta-trace protein test: new guidelines for the reliable diagnosis of cerebrospinal fluid fistula. Otolaryngol Head Neck Surg. 2003;129(5):508-17.
- Petereit HF, Bachmann G, Nekic M, Althaus H, Pukrop R. A new nephelometric assay for beta-trace protein (prostaglandin D synthase) as an indicator of liquorrhoea. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2001; 71(3):347-51.
- Sebia Hispania. Hydragel 6 β 2 TRF-H2. Esquema de trabajo. Sebia Hispania; 2021.
- McCudden CR, Senior BA, Hainsworth S, Oliveira W, Silverman LM, Bruns DE, Hammett-Stabler CA. Evaluation of high resolution gel beta(2)-transferin for detection of cerebrospinal fluid leak. Clin Chem Lab Med, 2013;51(2):311-5.
- Warnecke A, Averbeck T, Wurster U, Harmening M., Lenarz, T, Stover T. Diagnostic relevance of beta2-transferin for the detection of cerebrospinal fluid fistulas. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2004;130(10):1178-84.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Cárdenas M, Gimeno H, Lombardía C, De Miguel C. Utilidad de la β 2-transferina y la β -traza en el diagnóstico de fístula de líquido cefalorraquídeo. Rev Lab Clin. 2017;10(4):173-9.
- Dorta-Contreras A, Montoro E. Neuroinmunología clínica. La Habana: Editorial Academia; 2009

- Jaume A, Salle F, Devita A, Martínez F, Sgarbi N. Fístula de líquido cefalorraquídeo postraumática: propuesta de algoritmo diagnóstico y terapéutico. Arch Med Interna. 2015;37(1):47-52.

DESAFÍOS EN EL LABORATORIO CLÍNICO: MACROPROLACTINA

Autores: Leticia Martínez Alonso, Leticia Rodríguez Calviño, Patricia Martínez Loredo

Servicio de Análisis Clínicos, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Vigo

Palabras clave: Macroprolactina, Hiperprolactinemia, PEG

INTRODUCCIÓN

La prolactina es una hormona polipeptídica formada por 199 aminoácidos, con un peso molecular de 23 KDa. Esta hormona es sintetizada y secretada principalmente por las células lactotropas de la adenohipófisis, en respuesta al aumento de factores inductores como estrógenos, hormona liberadora de tirotropina (TRH), factor de crecimiento epidérmico y antagonistas dopaminérgicos. Es la única hormona hipofisaria que está sometida a control negativo por el hipotálamo, con la secreción de dopamina. En las mujeres, la prolactina favorece la producción de leche en las glándulas mamarias y también estimula la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo, mientras que su función en los varones se desconoce.¹

En la circulación sanguínea existen diferentes isoformas de prolactina, siendo la forma activa la prolactina monomérica. La presencia de macroprolactina (isoforma de mayor peso molecular y muy baja actividad biológica *in vivo*) es una de las causas principales que produce interferencias en la determinación y que, si no se identifica, puede dar lugar a diagnósticos erróneos y manejo incorrecto del paciente.²

El objeto de este capítulo es realizar una revisión de la utilidad e interpretación de la determinación de prolactina en suero, describir las formas moleculares en las que se puede encontrar y en especial, ofrecer un repaso más exhaustivo de una de ellas, la macroprolactina. Expondremos su posible significación clínica, los métodos de detección existentes y la importancia que tiene su identificación en el correcto diagnóstico del paciente, mejorando así su seguridad.

HIPERPROLACTINEMIA

• Etiología

La hiperprolactinemia es la hiperfunción pituitaria más frecuente y puede deberse a diversas causas:

- **Fisiológicas:** Embarazo, lactancia y estimulación mamaria, esfuerzo físico, estrés e ingesta de alimentos.
- **Patológicas:** Prolactinoma (causa más frecuente y representa el 30% de los adenomas hipofisarios), disminución de la inhibición dopaminérgica, otros trastornos hipotalámicos o hipofisarios y síndrome del ovario poliquístico.
- **Farmacológicas (causa más frecuente de hiperprolactinemia no tumoral):** Consumo de antieméticos, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), antipsicóticos, opiáceos, antidopaminérgicos, estrógenos, etc.
- **Otras causas:** Idiopática, mutación en el gen PRLR, hipotiroidismo primario, cirrosis y disminución del aclaramiento de prolactina, que puede ser debida a una

insuficiencia renal crónica o a la existencia de macroprolactinemia.

Respecto a la macroprolactinemia, como se verá más adelante, ésta no tiene un significado clínico directo, pero los pacientes pueden ser diagnosticados erróneamente de hiperprolactinemia mal clasificada como idiopática.

• Clínica

La hiperprolactinemia, independientemente de la causa que la produzca, interfiere en la secreción pulsátil de la GnRH, inhibiendo la secreción de LH y FSH. Aunque la galactorrea y la disfunción reproductiva son las características fundamentales de la hiperprolactinemia patológica, se ha observado que los síntomas producidos por esta entidad son género específicos.

- **Mujeres:** Por orden de frecuencia, infertilidad, oligomenorrea, hirsutismo, amenorrea y galactorrea.
- **Hombres:** Puede causar infertilidad, disminución de la libido y galactorrea.

En ambos sexos puede producir síntomas neurológicos como defectos del campo visual y dolor de cabeza, llegando a causar osteoporosis en casos avanzados.

• Utilidad de la medición de prolactina

La medida de prolactina en suero es uno de los parámetros bioquímicos utilizados con mayor frecuencia en el estudio de pacientes con trastornos reproductivos. Otras indicaciones para su determinación son la sospecha de disfunción o masa hipofisaria y la monitorización de pacientes con tratamiento antipsicótico (principalmente antidopaminérgicos).

• Condiciones preanalíticas

La prolactina posee ritmo circadiano aumentando a los 90 minutos de iniciado el sueño y permaneciendo elevada hasta 2 horas tras despertar, así como secreción pulsátil con descarga cada 20-30 minutos. Además, se eleva discretamente durante el pico ovulatorio. Todos estos factores, así como el hecho de que aumenta en ciertas condiciones como el estrés o el esfuerzo físico hacen sospechar que la fase preanalítica va a tener gran importancia en su determinación e interpretación. Se ha desarrollado un protocolo preanalítico en el que se recogen las condiciones idóneas para la extracción de la muestra de suero, con el que se ha demostrado que se reducen las falsas hiperprolactinemias (Tabla 1).

<ul style="list-style-type: none"> • Estar despierto 2 horas antes de la extracción, sin realizar ningún esfuerzo físico
<ul style="list-style-type: none"> • Evitar una dieta rica en proteínas y grasas desde el día anterior a la extracción
<ul style="list-style-type: none"> • Evitar la estimulación mamaria desde el día anterior a la extracción
<ul style="list-style-type: none"> • Estar 8-10 horas en ayuno antes de la extracción
<ul style="list-style-type: none"> • No tomar medicamentos que pudieran elevar o disminuir la prolactina
<ul style="list-style-type: none"> • Estar relajado o haber descansado durante al menos 30 minutos antes de la extracción
<ul style="list-style-type: none"> • No estar en situación de estrés

Tabla 1. Condiciones idóneas para la extracción de prolactina. Adaptado de: Robles Rodríguez JL *et al*, 2010.

• Determinación de prolactina e interpretación

Actualmente la concentración de prolactina en suero se mide con inmunoensayos automatizados tipo sándwich. En la fase de incubación la prolactina reacciona con un anticuerpo de captura unido a la fase sólida y un anticuerpo de detección marcado. Tras una fase de lavado para eliminar el exceso de anticuerpos marcados no unidos, se mide la señal generada, cuya magnitud es directamente proporcional a la concentración de prolactina presente en el suero (Figura 1).

La mayoría de los inmunoensayos utilizados hoy en día para la determinación de prolactina están calibrados frente al tercer estándar internacional de la OMS 84/500. Sin embargo, existe una falta de conmutabilidad entre métodos, debido principalmente a las diferencias de especificidad de los anticuerpos utilizados, por lo que los valores de referencia son método-dependientes y deben ser establecidos en función del mismo. También son específicos por sexo, siendo mayores en mujeres. Beltran *et al.*³ propusieron valores de referencia en función del método utilizado (Tabla 2).

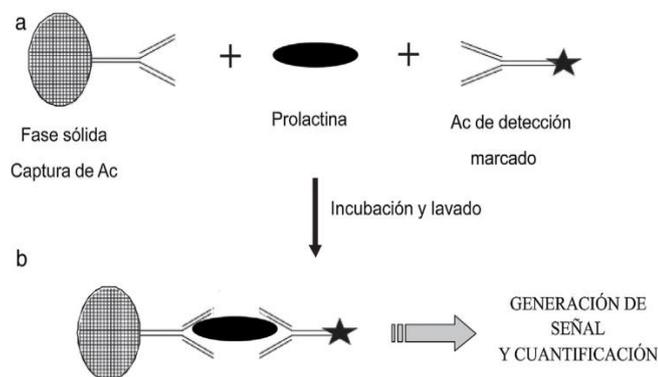


Figura 1. Esquema de un inmunoanálisis para la medición de prolactina. **a:** Etapa de incubación; **b:** Etapa de detección. Tomada de: Biagetti B *et al*, 2021.

Para la correcta interpretación de un resultado elevado de prolactina es necesario realizar un buen diagnóstico diferencial, así como considerar posibles factores preanalíticos que provocan hiperprolactinemia. Se debe

conocer la historia clínica detallada del paciente para detectar posibles causas, incluyendo su historia farmacológica. Se recomienda realizar pruebas de función tiroidea, hepática y renal en todos los pacientes con hiperprolactinemia y descartar el embarazo en mujeres en edad fértil.

A pesar de que hay superposición entre las concentraciones de prolactina de etiologías diferentes, sus valores pueden ayudar al diagnóstico:

- **> 500 ng/mL** sugiere macroprolactinoma.
- **100 - 250 ng/mL** sugiere microprolactinoma, si se descartan otras causas de elevación, entre las que se encuentran la ingesta de fármacos como neurolepticos y antipsicóticos que provocan un aumento de prolactina (alcanzando valores superiores a 200 ng/mL en el caso de metoclopramida, risperidona y fenotiazinas).
- **25 - 100 ng/mL** sugiere que la elevación se puede deber a causas fisiológicas como estrés, fármacos, adenoma hipofisario, macroprolactinemia, etc.

Por último, si obtenemos un valor de prolactina ligeramente por encima del límite alto de normalidad o discrepante con la clínica es recomendable repetir la extracción con un catéter intravenoso, realizando una extracción basal y otra a los 20 minutos, minimizando así el efecto del estrés debido a la venopunción y la pulsatilidad.

• Tratamiento

El tratamiento va a depender de la causa subyacente de hiperprolactinemia. En cuanto a los prolactinomas, se recomienda tratar a los pacientes con microprolactinomas sintomáticos y con macroprolactinomas. Los pacientes con microprolactinomas asintomáticos no siempre necesitan tratamiento.

Método	Límite inferior	Límite superior	Fabricante
Hombres			
Access	58	277	56-278
Centaur	63	262	45-375
Immulite	70	281	53-360
Elecsys	72	331	86-324
Architect	85	310	54-381
AIA	89	365	91-440
Mujeres			
Access	71	348	59-619
Centaur	75	396	40-530
Immulite	77	408	71-566
Elecsys	88	492	102-496
Architect	98	447	25-629
AIA	105	548	111-780

Tabla 2. Valores de referencia de prolactina total (mUI/mL) en suero para cada plataforma de inmunoensayo (1ng/mL = 21.2 mUI/L). Adaptado de: Beltran L *et al*, 2008.

La primera elección de tratamiento son los agonistas dopaminérgicos, como la bromocriptina o la cabergolina. En algunos casos se puede necesitar tratamiento quirúrgico y/o radioterapia. En aquellos pacientes que no respondan al tratamiento exclusivo con agonistas dopaminérgicos puede ser necesario el tratamiento con gonadotropinas o GnRH para inducir la fertilidad.

En el caso de la hiperprolactinemia farmacológica, el tratamiento debe limitarse a los pacientes que tengan síntomas y en los que no se pueda cambiar o retirar dicho fármaco. En estos casos, pacientes con hipogonadismo y/o disminución de la masa ósea pueden recibir tratamiento sustitutivo con estrógenos en el caso de mujeres y testosterona en hombres.

Por otro lado, existe mucha controversia acerca de si los pacientes con hiperprolactinemia causada por antipsicóticos deben ser tratados con agonistas dopaminérgicos.

FORMAS CIRCULANTES DE PROLACTINA

- **Monomérica:** Es la prolactina “libre”. No está glicosilada y presenta un peso molecular de 23 kDa. Representa la forma mayoritaria en suero (65-85%), siendo la forma biológicamente activa.
- **Big:** Consiste en dímeros o trímeros glicosilados con un peso molecular de 60 kDa. Representa entre un 15-30% de la prolactina en suero y tiene una bioactividad reducida.
- **Big-big (macroprolactina):** Se compone de agregados de prolactina o moléculas de prolactina unidas a inmunoglobulinas, mayoritariamente IgG. Su peso molecular es mayor de 150 kDa, representa menos del 10% de la prolactina circulante y es una forma biológicamente inactiva.⁴

MACROPROLACTINEMIA

La macroprolactinemia es la hiperprolactinemia debido al exceso de formas Big-Big de elevado peso molecular con concentraciones normales de prolactina monomérica. Su identificación representa un desafío analítico ya que la prevalencia de macroprolactinemia en pacientes con prolactina elevada es de un 10-40% mientras que en la población general es de aproximadamente un 3,7%. Este amplio rango de prevalencia puede ser debido a las discrepancias que existen entre los distintos estudios acerca de la elección del punto de corte, los valores de referencia para la concentración de prolactina tras polietilenglicol (PEG), tal como comentaremos más adelante, y la falta de conmutabilidad entre inmunoensayos (distintas reactividades cruzadas frente a la macroprolactina).

La presencia de macroprolactina se debe de sospechar ante una hiperprolactinemia asintomática o ante una discordancia clínico-bioquímica, debido a que esta forma es inmunológicamente detectable, causando la aparición de concentraciones de prolactina elevadas y constituyendo así una fuente de interferencia analítica. Es de gran importancia su identificación desde el laboratorio, ya que se trata de una entidad clínicamente benigna (forma biológicamente inactiva) que puede conducir a diagnósticos erróneos, pruebas adicionales y tratamientos innecesarios para el paciente.

• Detección de macroprolactina

Todos los inmunoensayos disponibles en los laboratorios clínicos detectan la macroprolactina de forma variable dependiendo de los anticuerpos de captura o de detección del método, sin diferenciarla de la forma monomérica de la prolactina. Para la determinación de macroprolactina se pueden utilizar los siguientes métodos:

- **Cromatografía de fijación en gel (CFG):** Se considera el "gold standard", aunque presenta los inconvenientes de que es una técnica larga, laboriosa, costosa y no se encuentra disponible en la mayoría de laboratorios clínicos. Permite la separación e identificación de las tres isoformas de prolactina. Actualmente, este método se reserva para la confirmación en casos de discrepancia entre el resultado de prolactina tras tratamiento con PEG y la clínica. Ver Figura 2.

- **Inmunoanálisis tras la precipitación de macroprolactina con PEG** al 25% (25 g de PEG disueltos en 100 mL de agua desionizada): Este método es el que mejor se correlaciona con la CFG, teniendo la ventaja de que es una técnica sencilla, rápida, barata y reproducible. Actualmente es la técnica recomendada para el cribado de macroprolactinemia y la más utilizada en los laboratorios clínicos, si bien es necesario tener en cuenta que también presenta una serie de limitaciones:

1. Con el PEG, además de la macroprolactina, también precipita el 20-25% de la prolactina monomérica, por lo que se puede subestimar la concentración de prolactina.
2. El uso de PEG puede producir interferencia en la medida en algunos inmunoensayos.
3. En casos de macroprolactina unida a IgA se pueden producir falsos negativos, debido a que esta no precipita completamente.
4. Pueden darse falsos positivos en pacientes con hipergammaglobulinemia.

- **Otros:**

1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Es un método rápido que permite la separación de las tres formas de prolactina. No existen muchos estudios hasta la fecha, pero podría ser de utilidad en los casos de discrepancia entre la concentración de prolactina post-PEG y la clínica.
2. Inmunoanálisis tras la precipitación de prolactina mediante ultrafiltración o mediante inmunoadsorción de las especies de IgG con proteína A, proteína G o IgG antihumana.^{4,5}

• Cribado de macroprolactinemia

A la pregunta de en qué situaciones sería conveniente realizar un cribado de macroprolactinemia, no hay una respuesta clara.

Sí que existe consenso acerca de que solamente las muestras con hiperprolactinemia deben ser estudiadas, pero hay controversia a la hora de decidir si es necesario realizar el estudio de macroprolactina en pacientes que presentan los síntomas clásicos de hiperprolactinemia. Esta controversia se debe a la observación de que pacientes con

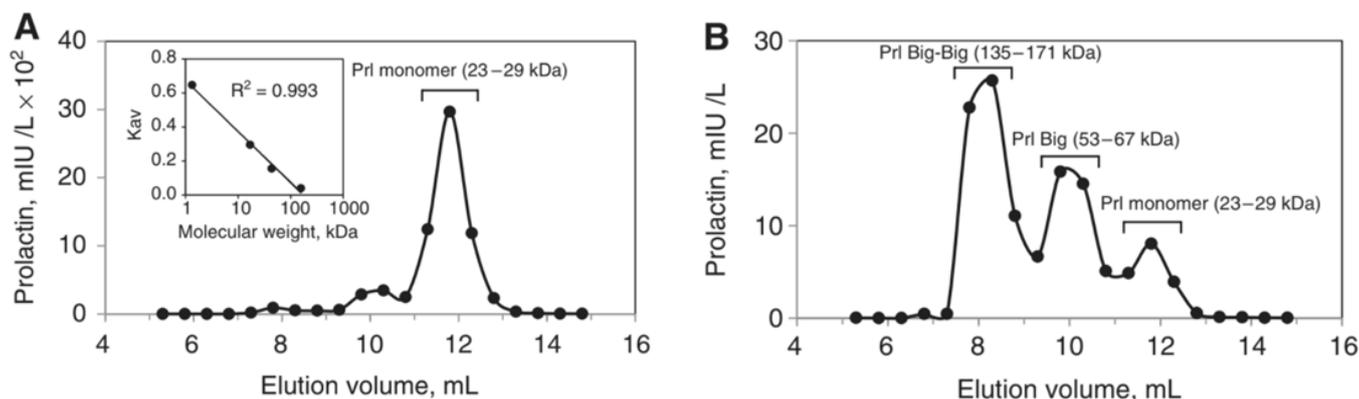


Figura 2. Análisis de isoformas de prolactina en suero por CFG. **A:** Hiperprolactinemia verdadera; **B:** Macroprolactinemia.

Tomado de: Overgaard M *et al*, 2017.

macroprolactinemia también pueden padecer estos síntomas, en cuyo caso sería necesario diferenciar ambas entidades, empleando para ello dicho estudio.

Tampoco existe armonización acerca de la selección del punto de corte idóneo para realizar el estudio de macroprolactina. Šostarić *et al.*⁶ propusieron un algoritmo en el que se recogen los criterios para la realización del cribado (Figura 3).

Dicho algoritmo ha sido elaborado con concentraciones de prolactina obtenidas en el analizador Roche cobas e601 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), utilizando el inmunoensayo Elecsys Prolactin II. En el cribado de macroprolactinemia son excluidos aquellos pacientes con causas conocidas de hiperprolactinemia y presencia de fármacos que aumentan la prolactina. También se excluye a los pacientes con resultado de prolactina > 470 µg/L, puesto que aunque haya presencia de macroprolactina, con estos resultados no se puede descartar un prolactinoma. Además, concluyen que no se puede asumir que la macroprolactinemia no se desarrollará en un futuro, incluso en el caso de haber sido excluida previamente; por tanto, si ha pasado más de un año desde un test de cribado de macroprolactina negativo (recuperación tras PEG > 40%), no se descarta la realización de un nuevo test.

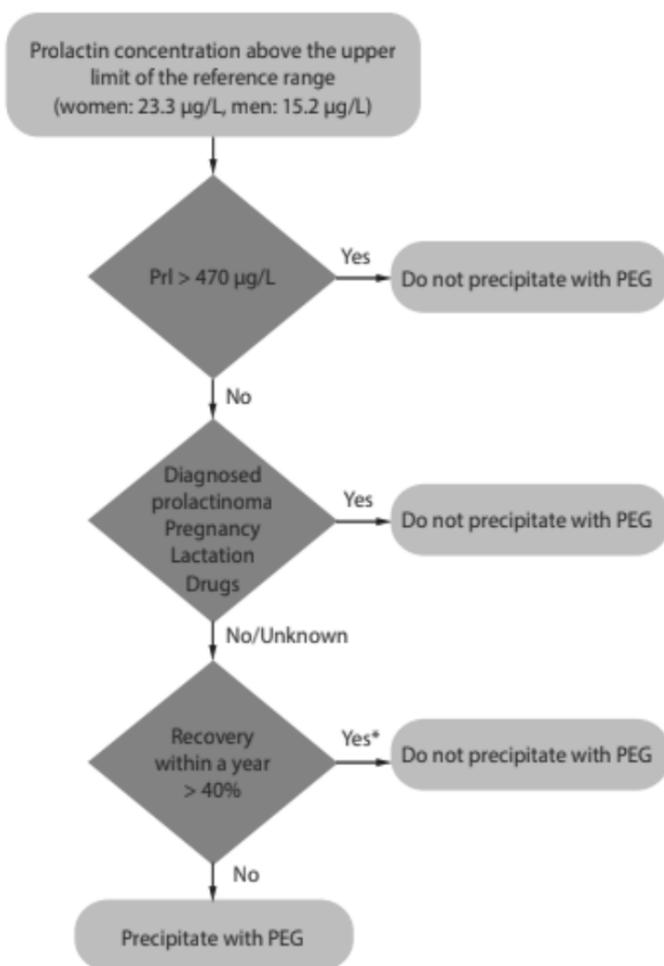


Figura 3. Algoritmo con criterios para la realización del test de precipitación de macroprolactina con PEG. Tomado de: Šostarić M *et al.*, 2018.

En la práctica clínica existen tres enfoques diferentes a seguir en el cribado de macroprolactinemia:

- Cribado guiado por el clínico, recomendado por algunas guías clínicas. En este enfoque el clínico es el que solicita el estudio, presentando el problema de que se pueden estar infradiagnosticando casos de macroprolactinemias, con la consiguiente problemática que esto puede generar en el paciente.
- Cribado guiado por el laboratorio clínico. Los profesionales de laboratorio emiten una alerta junto a los resultados de hiperprolactinemia recordando que puede existir una posible interferencia y recomendando la realización del estudio en caso de que exista discrepancia con la clínica.
- Cribado universal. Consiste en la determinación de macroprolactina a todos los pacientes que presentan hiperprolactinemia. Con esta estrategia se reducen los diagnósticos erróneos, pero se genera un aumento importante de la carga de trabajo y de los costes para el laboratorio.
 - **Procedimiento del tratamiento con PEG para la precipitación de macroprolactina**

En el documento de consenso publicado en el año 2021 por el grupo de trabajo de laboratorio de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN) y la comisión de hormonas de la Sociedad Española de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (SEQCML)⁵, se establece el siguiente procedimiento:

1. Mezclar volúmenes iguales de suero del paciente y solución de PEG 6000 al 25%.
2. Mezclar durante 30 segundos en vórtex.
3. Centrifugar a 3500 rpm durante 30 minutos.
4. Determinar la concentración de prolactina en el sobrenadante y corregir con el factor de dilución (x2). Ésta corresponde a la prolactina monomérica del paciente.
5. Calcular el porcentaje de recuperación de prolactina monomérica con la siguiente fórmula:

$$\%Recuperación = \frac{Prolactina\ tras\ PEG\ (x2)}{Prolactina\ inicial} \times 100$$

- **Interpretación clínica de macroprolactinemia. Informe de resultados**

Se puede informar la presencia de macroprolactina siguiendo dos enfoques diferentes:

- Porcentaje de recuperación de prolactina monomérica tras precipitación con PEG. Existen multitud de estudios, realizados con métodos diferentes, en los que se establecen distintos puntos de corte para el porcentaje de recuperación. Los más utilizados varían entre valores inferiores a 40-60% para establecer la presencia de macroprolactina.

En líneas generales, si el porcentaje de recuperación es bajo habrá un predominio de moléculas de macroprolactina, es decir, se obtiene un resultado de macroprolactina positivo. Si el porcentaje de recuperación es elevado habrá un predominio de

moléculas de prolactina monomérica, por lo que el resultado de macroprolactina es negativo.

- Concentración de prolactina monomérica tras precipitación con PEG. Se debe informar junto con los valores de referencia que correspondan según el método utilizado.

El porcentaje de recuperación de prolactina monomérica tras precipitación con PEG tiene como inconveniente que no excluye una concentración elevada de prolactina monomérica concomitante con la macroprolactina. Por ello, tiene especial relevancia la forma de expresar los resultados. Se recomienda indicar en el informe de resultados la concentración de prolactina monomérica tras precipitación con PEG con los valores de referencia establecidos según el método empleado y la presencia/ausencia de macroprolactina.

En cuanto al seguimiento de los pacientes con macroprolactinemia, no se requieren controles seriados del valor de prolactina monomérica, puesto que se ha observado que el porcentaje de macroprolactina con respecto a la prolactina total se mantiene estable en el tiempo. Así, siguiendo las recomendaciones del documento consenso de la SEEN y la SEQCML⁵, la revaloración de macroprolactina en un paciente determinado únicamente estaría indicada en casos de clínica compatible con hiperprolactinemia y aumento de la concentración de prolactina total respecto a valores previos.

CONCLUSIÓN

Ante una hiperprolactinemia sin causa identificada ni clínica asociada es de gran importancia tener presente la posibilidad de la presencia de macroprolactina y actuar en consecuencia. La identificación de macroprolactinemia es esencial para evitar diagnósticos erróneos y pruebas y tratamientos derivados innecesarios, que repercutirán en la seguridad del paciente.

La gran variabilidad que existe entre los diferentes métodos y la falta de consenso sobre el tema hace que en muchas ocasiones la interpretación de los resultados sea compleja, siendo necesaria una estrecha colaboración y comunicación entre los clínicos y los especialistas de laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, et al. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(2):273-88.
2. Overgaard M, Pedersen SM. Serum prolactin revisited: parametric reference intervals and cross platform evaluation of polyethylene glycol precipitation-based methods for discrimination between hyperprolactinemia and macroprolactinemia. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(11):1744-53.
3. Beltran L, Fahie-Wilson MN, McKenna TJ, Kavanagh L, Smith TP. Serum total prolactin and monomeric prolactin reference intervals determined by precipitation

with polyethylene glycol: evaluation and validation on common immunoassay platforms. *Clin Chem.* 2008;54(10):1673-81.

4. Fahie-Wilson M, Smith TP. Determination of prolactin: The macroprolactin problem. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013;27(5):725-42.
5. Biagetti B, Ferrer Costa R, Alfayate Guerra R, Álvarez García E, Berlanga Escalera E, Casals G, et al. Macroprolactina: del laboratorio a la práctica clínica. Recomendaciones del grupo de trabajo de laboratorio de la SEEN y de la comisión de hormonas de la SEQCML sobre la medición e informe del resultado de la macroprolactina. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2021;69(1):63-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2020.12.002>
6. Šostarić M, Bokulić A, Marijančević D, Zec I. Optimizing laboratory defined macroprolactin algorithm. *Biochem Med.* 2019;29(2):020706.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Alfayate R, Fajardo C, González-Clemente JM. Diagnóstico de laboratorio en endocrinología. Madrid: Nature ; 2015.
- Halperin Rabinovich I, Cámara Gómez R, García Mouriz M, Ollero García-Agulló D. Guía clínica de diagnóstico y tratamiento del prolactinoma y la hiperprolactinemia. *Endocrinol Nutr.* 2013;60(6):308-19.
- Jimenez-Anon L, Barallat J, Regidor D, Urgell E, Dolade M, Granada ML. Assessment of intraindividual agreement in prolactin results after post-polyethylene glycol precipitation test for the estimation of macroprolactin. Should the precipitation procedure be repeated in the same patient? *Clin Chem Lab Med.* 2020;59(1):e27-e29. Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2020-0858/html>
- Melmed S, Auchus RJ, Goldfine AB, Koenig RJ, Rosen CJ. Williams, Tratado de endocrinología. 14ª ed. Barcelona: Elsevier España; 2021.
- Robles Rodríguez JL, Castaño López MA. Empleo de un nuevo protocolo de extracción y disminución de las falsas hiperprolactinemias. *Endocrinol Nutr.* 2010;57(7):296-300.

ETIL GLUCURÓNIDO EN ORINA COMO MARCADOR DEL CONSUMO DE ALCOHOL

Autores: Pilar Duarte García; Ángel Camilo López Regueiro; David Melero López

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

Palabras clave: Alcohol, Etanol, Etil glucurónido

INTRODUCCIÓN

En el año 1969 la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió droga como “toda sustancia que, introducida en un organismo vivo, pueda modificar una o varias de sus funciones”. Esta definición es poco útil e inexacta, ya que engloba tanto fármacos de prescripción como sustancias psicoactivas, muchas plantas, sustancias químicas o tóxicos para el organismo. El término droga de abuso define mejor lo que coloquialmente entendemos como droga: “sustancia de uso no médico con efectos psicoactivos (capaz de producir cambios en la percepción, el estado de ánimo, la conciencia y el comportamiento) y susceptible de ser autoadministrada”. Se han propuesto diferentes sistemas de clasificación de las drogas de abuso. Uno de ellos las divide según su estatus legal en legales o bien ilegales/ilícitas. Referente a su origen, se pueden distinguir las drogas naturales de las sintéticas. En función de los supuestos riesgos para la salud, también se habla de drogas duras o blandas. Finalmente, con respecto a sus efectos sobre el sistema nervioso central, las drogas se pueden clasificar en estimulantes (activan), depresoras (disminuyen el grado de actividad) o psicodélicas (producen alteraciones perceptivas). En todo caso, todas las drogas de abuso coinciden en su capacidad para producir dependencia.

En población general las drogas legales son las que presentan mayores prevalencias de consumo. Siendo el alcohol etílico (etanol) el psicoactivo más extendido. Basándonos en las distintas clasificaciones mencionadas, el alcohol estaría encuadrado en el grupo de las drogas de abuso legales, naturales, blandas y depresoras. Según recoge la OMS¹ cada año se producen 3 millones de muertes en el mundo debido al consumo nocivo de alcohol. Esta cifra supone el 5.1% del total de las defunciones mundiales anuales. En el grupo de edad entre 15 y 49 años este porcentaje asciende hasta un 10%. Además, la OMS señala diferencias entre sexos: un 7.1% de las muertes al año de varones están relacionadas con el consumo de alcohol, en las mujeres esta proporción disminuye hasta el 2.2%. A nivel nacional el Ministerio de Sanidad² estima más de 15000 fallecimientos anuales causados por la ingesta de etanol, siendo el 74% de ellos hombres. Según recoge el Observatorio Español de Drogas y Adicciones (OEDA) en su Memoria 2021³, la prevalencia del consumo de alcohol en nuestro país se ha mantenido estable y en niveles elevados desde la década de 1990. Cabe destacar la tendencia a la baja de los bebedores diarios desde 2001, que alcanzó el valor más bajo de toda la serie histórica en 2017, pero ha aumentado en más de un punto en 2019/2020. Además, se encuestó a la población española acerca del consumo de alcohol en los últimos 30 días, siendo la prevalencia de respuestas afirmativas de un 63%. Un 57.4 % de este 63%

fueron hombres y un 64.7% de edad comprendida entre 25 y 34 años. La bebida más consumida resultó ser la cerveza.

Estas características individuales diferenciadas por el OEDA resultan necesarias a la hora de evaluar el consumo de alcohol (y en general cualquier tipo de droga) en una persona. Así pues, las mujeres tienen una mayor susceptibilidad a los efectos del etanol, necesitando menores cantidades para alcanzar los efectos. En relación a la edad de primer contacto con la droga, el riesgo de desarrollar abuso o dependencia hacia una sustancia es mayor cuanto más precoz sea el contacto con ella. Además, según la frecuencia de consumo se va haciendo más intensa, el desarrollo de tolerancia farmacológica (necesidad de incrementar la dosis para conseguir los mismos efectos) se hace más probable, lo que aumenta también los efectos secundarios y tóxicos. En este aumento también está implicada la presencia de una patología preexistente en la persona.

El consumo de bebidas alcohólicas es casi tan antiguo como la humanidad y algunos de sus efectos perjudiciales están ya descritos en los textos bíblicos. A partir de la Edad Media, el alcohol llegó a ser considerado como un remedio para prácticamente todas las enfermedades, sin embargo, actualmente la OMS afirma que cualquier consumo implica un riesgo, ya que, para determinadas enfermedades (gastrointestinales, cáncer y lesiones) no existe un nivel seguro. El uso nocivo de alcohol es un factor causal de más de 200 enfermedades y trastornos. Cualquier consumo implica riesgos para la salud tanto a largo como a corto plazo. Se ha relacionado la ingesta crónica y excesiva de etanol con trastornos en tres grandes órganos: el hígado, el sistema nervioso y el corazón. Sobre el hígado, puede producir esteatosis, fibrosis, hepatitis y cirrosis. Sobre el sistema nervioso puede ser responsable, a través de déficit nutricionales como la tiamina, de diversas enfermedades como el síndrome de Wernicke-Korsakoff, la ambliopía alcohol-tabaco, la pelagra o el beri-beri; también se ha asociado a algunos tipos de demencia, degeneración de la corteza cerebelosa, mielinolisis pontina central, enfermedad de Marchiafava-Bignami y polineuritis. Finalmente, sobre el corazón, puede ser responsable de una miocardiopatía dilatada. Además, las bebidas alcohólicas se han clasificado como cancerígenas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, aumentando el riesgo de varios tipos de tumores: cavidad oral, faringe, laringe, esófago, colon-recto, mama (en mujeres) y hepatocarcinoma. No hay un límite de consumo que permita evitar el riesgo de desarrollar estos cánceres, siendo mayor el riesgo cuanto mayor es el consumo. El alcohol como inmunosupresor aumenta el riesgo de enfermedades infecciosas, incluidas la tuberculosis y el VIH. También se ha descrito una relación causal entre el consumo nocivo de alcohol y una serie de

trastornos mentales y comportamentales. En mujeres gestantes los daños potenciales ocasionados por el alcohol sobre el desarrollo del feto pueden ser variados, desde abortos o bajo peso al nacer hasta una amplia gama de discapacidades conocidas como espectro alcohólico fetal, de difícil diagnóstico y que perdurarán toda la vida, con repercusiones a nivel físico, del comportamiento e intelectuales. La manifestación más extrema de este espectro es el síndrome alcohólico fetal. A corto plazo el etanol tiene efectos negativos sobre la coordinación, reflejos y capacidad de autocritica. Además de provocar una desinhibición de la conducta, lo que conlleva un mayor riesgo de tomar decisiones equivocadas, mayor posibilidad de ejercer o padecer actos violentos, practicar sexo no seguro o de sufrir o causar lesiones por accidentes de tráfico u otras causas. La ingesta elevada de alcohol en un corto periodo de tiempo es la responsable de la intoxicación etílica aguda. Este episodio puede venir acompañado de complicaciones por hipoglucemia, hipotensión arterial, hipotermia, fibrilación auricular transitoria, vómitos o caídas al suelo por ataxia o disminución de la conciencia.

Más allá de la problemática sanitaria y de salud pública, el consumo nocivo de alcohol provoca pérdidas sociales y económicas importantes, tanto para las personas como para la sociedad en su conjunto. A nivel social incrementa las inseguridades y desigualdades. En el ámbito económico disminuye la productividad y, en el caso de España, supone un coste del 1% del PIB (más de 10.000 millones de euros anuales).

METABOLISMO DEL ETANOL

Tras la ingesta de alcohol, la mayor fracción de absorción se produce en la parte proximal del intestino delgado –duodeno y yeyuno– (80%), una menor fracción en el estómago (15-20%) y mucho menos en el colon. La absorción a nivel de intestino delgado es mucho más rápida que a nivel estomacal, por ello la velocidad del vaciamiento gástrico es un determinante importante de la rapidez de la absorción de etanol administrado por vía oral. Además, la velocidad de absorción determina la magnitud de sus concentraciones plasmáticas, así como la intensidad y duración de sus efectos tóxicos. El pico de concentración de etanol en sangre se suele producir entre los 20 y los 60 minutos post ingesta. Puesto que no hay proteínas plasmáticas que unan etanol, los tejidos alcanzan rápidamente un equilibrio con la concentración alcohólica del plasma. La cantidad de etanol que entra en los tejidos es dependiente de su contenido relativo de agua. Al tratarse el etanol de un compuesto hidrosoluble a la vez que liposoluble, presenta la capacidad de atravesar membranas y barreras (como la hematoencefálica o la placentaria). Así pues, todos los cambios de medio anteriormente descritos ocurren por difusión pasiva. Aproximadamente el 94% del etanol ingerido se oxida en el hígado, y solamente el 1% se metaboliza por conjugación. El resto, un 5% no se metaboliza y se elimina por los riñones (orina), piel (sudor) y pulmones (respiración).

• Metabolismo oxidativo del etanol

El primer paso del metabolismo oxidativo se produce en el hígado por tres vías (Figura 1):

- Principalmente por la enzima citosólica alcohol-deshidrogenasa (ADH), que lo transforma en acetaldehído. Esta enzima tiene una Km baja para el etanol y oxida la mayor parte en los bebedores moderados, siguiendo una cinética de orden 0 aproximadamente. Los diferentes polimorfismos de la ADH son responsables de las variaciones raciales y étnicas en la farmacocinética del etanol. Aunque el hígado es el lugar donde se localiza en mayor proporción esta enzima, otros órganos como el tracto gastrointestinal o los pulmones también expresan una o varias isoenzimas.
- Otra ruta menor de la oxidación del etanol a acetaldehído es la catalizada por la enzima citocromo P450 2E1 (CYP2E1), localizada exclusivamente en el retículo endoplasmático y las mitocondrias de los hepatocitos. La CYP2E1 presenta una Km elevada para el etanol y concentraciones altas de alcohol (bebedores crónicos) inducen su transcripción de *novo*. Las concentraciones bajas conducen a la estabilización de la apoproteína CYP2E1.
- Aunque bajo condiciones fisiológicas normales su papel en la oxidación del alcohol parece ser insignificante, la catalasa también es capaz de transformar el alcohol en acetaldehído. Esta enzima se localiza en el peroxisoma y normalmente cataliza la transformación de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Con respecto a su distribución por órganos, se expresa mayoritariamente en el hígado aunque también la encontramos en el intestino, macrófagos o pulmones. Como ya se ha comentado, algunos autores defienden que el papel de la catalasa como oxidadora del etanol es significativo únicamente *in vitro*, al ser limitantes los bajos niveles de peróxido de hidrógeno *in vivo*.

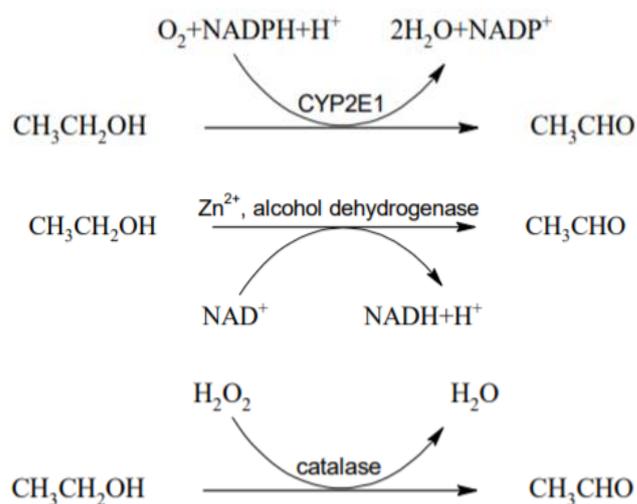


Figura 1. Las tres posibles vías de transformación del etanol en acetaldehído. Tomado de: Birková A *et al*, 2021.

El acetaldehído se oxida posteriormente a acetato por la acetaldehído-deshidrogenasa (ALDH) (Figura 2). La isoforma 2 hepática de esta enzima es responsable de aproximadamente el 50% del aclaramiento de acetaldehído circulante después de la ingestión de etanol. Al igual que

ocurría con la ADH, los diferentes polimorfismos de ALDH están implicados en la existencia de diferentes sensibilidades frente al consumo de alcohol.

La mayoría del acetato es captado por el músculo y el corazón, que tienen una elevada actividad acetil-CoA-sintetasa. Esta enzima cataliza la transformación de acetato en acetil-CoA en una reacción dependiente de ATP (Figura 2).

Dependiendo de la disponibilidad energética del organismo, el acetil-CoA obtenido se puede usar para la síntesis de ácidos grasos *de novo* o puede entrar en el ciclo de Krebs para la obtención de energía.

La velocidad de eliminación sanguínea del etanol depende de factores como el hábito alcohólico o el sexo. Además, la mujer alcanza una mayor tasa de alcoholemia que el hombre al ingerir la misma cantidad de alcohol. Esto está causado por la menor masa corporal femenina, mayor proporción de grasa y menor expresión de ALDH en la mucosa gástrica.

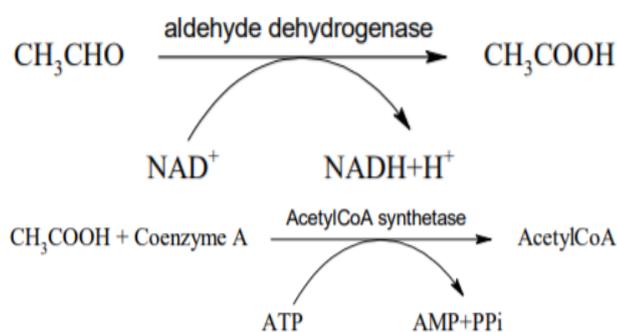


Figura 2. Segunda (arriba) y tercera (abajo) reacción de la vía del metabolismo oxidativo del etanol. Tomado de: Birková A *et al*, 2021.

• Metabolismo no oxidativo del etanol

Como hemos mencionado anteriormente, un pequeño porcentaje del etanol consumido es metabolizado por conjugación o esterificación. Estas vías metabólicas pueden ver incrementada su actividad si el metabolismo oxidativo está inhibido. Debido a las tasas de eliminación más lentas, los metabolitos no oxidativos del alcohol persisten en los fluidos y tejidos corporales durante mucho más tiempo que el propio etanol en sí. Además, se ha visto que los productos de estas vías pueden ser tóxicos, contribuyendo al daño tisular mediado por etanol.

- Las ácido-graso-etil-éster sintasas catalizan la reacción entre el etanol y el ácido graso para formar ácidos grasos etil ésteres (FAEEs). Estas sintasas se localizan en varios tejidos, especialmente en el hígado y el páncreas, dos órganos muy susceptibles a la toxicidad del alcohol. La síntesis de los FAEEs se produce en el retículo endoplasmático para, posteriormente, salir de la célula y circular por la sangre unidos a albúmina principalmente. Se ha descrito la detección de FAEEs en sangre hasta 24 horas después del consumo de alcohol.

- La actividad de la fosfolipasa D2 asociada a membrana es responsable de la formación de fosfatidiletanol (PEt) por un proceso de transfosforilación entre fosfatidilcolina y etanol. El PEt se incorpora a la membrana celular de los hematíes y tiene una vida media de hasta 28 días tras el consumo de alcohol.
- El etilglucurónido (EtG) se forma en el hígado cuando el etanol reacciona con ácido glucurónico. El proceso es catalizado por la superfamilia de enzimas UDP-glucuronosiltransferasa (UGT), utilizando el ácido UDP-glucurónico como cofactor. El resultado es un conjugado soluble fácilmente excretable a través de la orina (Figura 3).
- El etilsulfato (EtS) es otro conjugado del etanol producido por una sulfotransferencia: el etanol se conjuga en primer lugar con la 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato para posteriormente formar el EtS por acción de una sulfotransferasa (Figura 3).

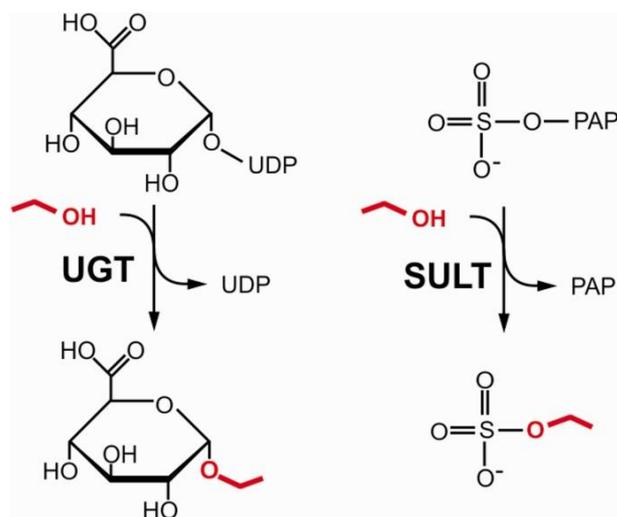


Figura 3. Reacción de formación del etilglucurónido (izquierda) y etilsulfato (derecha) a partir del etanol. Tomado de: Heier C *et al*, 2016.

MARCADORES DE INGESTA ALCOHÓLICA

La detección de biomarcadores de consumo de alcohol es una herramienta útil para la prevención de problemas sociales y de salud relacionado con su ingesta, permitiendo verificar objetivamente la información sobre la ingesta de etanol proporcionada por un sujeto. Estos marcadores ayudan a cuantificar el consumo de alcohol; identificar a las personas con riesgo de abuso, dependencia o susceptibles de presentar síntomas de abstinencia y evaluar la eficacia de los tratamientos en pacientes alcohólicos, identificando, algunos de ellos, el daño hepático.

Los biomarcadores que se analizan actualmente en los laboratorios reflejan el consumo tanto agudo como crónico e identifican el estado del paciente analizado. Todos ellos se pueden analizar en varios fluidos biológicos, aunque fundamentalmente es en la matriz biológica sangre (suero o plasma), donde se dispone de más datos. Los

biomarcadores se pueden clasificar en dos tipos: marcadores directos y marcadores indirectos (Figura 4).

- **Marcadores directos**

Biomarcadores formados como consecuencia del metabolismo del etanol o de su reacción con sustancias corporales. En esta categoría encontramos el etanol, algunos de sus derivados (FAEEs, EtG, EtS o PEt) así como algunos derivados del acetaldehído.

La ventaja que presentan los metabolitos derivados del alcohol frente a éste es que tienen una semivida de eliminación más larga que el etanol. Mientras que el alcohol se elimina rápidamente del cuerpo (a una velocidad de 0,1-0,25 g/l/h), haciéndose indetectable en pocas horas (su vida media es de 3,5 horas) tanto en sangre como en orina y aire espirado, sus derivados pueden detectarse a lo largo de horas o días. Así pues, resultan más útiles para la valoración del consumo de alcohol secundario a la ingesta de bebidas alcohólicas. El EtG, los FAEEs y el PEt han sido analizados en cabello, permitiendo su presencia en este tipo de muestra detectar consumos de varios meses atrás. A pesar de las ventajas y la utilidad de estos marcadores no oxidativos, actualmente su uso rutinario en clínica no está instaurado por la dificultad analítica y los costes del proceso. Quedando restringido su empleo al ámbito forense y de la investigación.

- Alcohol-Etanol (EtOH): se puede detectar en sangre, orina, saliva y aire espirado. La concentración de EtOH obtenida en suero es superior a la de sangre total porque el etanol se distribuye en el compartimento acuoso. En el caso de la saliva, la concentración de alcohol que se detecta es equivalente a la plasmática. No ocurre lo mismo con el aire alveolar, siendo la relación de EtOH sangre/aire de aproximadamente 2:1. La detección de etanol en un sujeto no permite distinguir el consumo agudo del crónico, solamente confirmar la presencia de la sustancia en el momento de la recogida de la muestra. El método de elección para la cuantificación de EtOH es enzimático, basado en la reacción de oxidación catalizada por la ADH.
- Ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs): han sido evaluados en muestras de sangre, orina y meconio. Sus concentraciones en sangre disminuyen a gran velocidad las primeras 24 horas. Sin embargo, pueden seguir siendo detectables hasta 4 días después de la última ingesta en bebedores que cumplen criterios de abuso. El cabello y el meconio proporcionan una ventana larga (varios meses) de detección de patrones de uso de etanol. La técnica de medición más comúnmente utilizada en estas dos muestras es la cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) o la cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC-MS/MS). Se piensa que los FAEEs del pelo son sintetizados de manera local, mientras que los que se detectan en meconio tienen un origen fetal (el etanol materno atraviesa la placenta, no así sus FAEEs).
- Etilsulfato (EtS): su presencia en orina se ha detectado incluso de 2 a 5 días después de la ingesta del alcohol. La valoración de la concentración detectada tiene mucha importancia cuando se relaciona con la del EtG.

- Etilglucurónido (EtG): su concentración en orina representa aproximadamente el 0,02-0,06% del total de etanol ingerido, siendo detectable en dicha matriz hasta 2-5 días después de la eliminación del alcohol del cuerpo. Este tiempo parece ser más largo en consumidores crónicos. Además de su detección en orina y sangre, también lo encontramos en pelo, meconio y tejidos post mortem. El EtG actúa como marcador tanto de consumo crónico como agudo de etanol.

- **Marcadores indirectos**

Biomarcadores formados como consecuencia de alteraciones metabólicas o patógenas ocasionadas por el consumo excesivo crónico o agudo de alcohol. En este grupo encontramos algunas enzimas hepáticas (gamma glutamiltransferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (AST) o alanina aminotransferasa (ALT), el volumen corpuscular medio (VCM) o la transferrina deficiente de carbohidratos (CDT). La GGT, el VCM y la CDT son los marcadores bioquímicos de ingesta habitual de alcohol más usados.

- Gamma-glutamiltransferasa (GGT): su actividad sérica se eleva con el aumento progresivo del consumo de etanol, encontrándose elevada en más del 75% de los alcohólicos. Por ello esta enzima hepática constituye el marcador de abuso de alcohol más usado en el laboratorio. Sin embargo, su sensibilidad disminuye en personas que abusan del alcohol pero que no presentan síntomas de alcoholismo. Otra desventaja que presenta la GGT es su inespecificidad: su elevación puede estar inducida por muchos medicamentos u otras patologías hepáticas.
- Alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST): la ALT es exclusiva de los hepatocitos mientras que la AST presenta una distribución tisular más variada con predominancia en el hígado y músculo esquelético. En la enfermedad hepática alcohólica suele haber mayor elevación de AST que de ALT, con una relación AST/ALT > 2. Como el etanol es un tóxico mitocondrial, este mayor aumento puede deberse a la liberación de la AST del interior de estos orgánulos. Las transaminasas no son tan sensibles o específicas para el consumo excesivo de alcohol como la GGT.
- Volumen corpuscular medio (VCM): es una medida del tamaño de los eritrocitos, observándose un incremento en este parámetro o macrocitosis en casos de bebedores crónicos. La existencia de correlación positiva entre el grado de consumo de alcohol y el tamaño de los glóbulos rojos le confiere ciertas ventajas a este biomarcador, sin embargo, no resulta útil para medir la abstinencia porque, al tener los hematíes 120 días de vida media, su normalización a valores de referencia tarda meses. El principal inconveniente que presenta el VCM es su baja sensibilidad (40%), aunque tiene una especificidad elevada en pacientes alcohólicos (80-90%). Existen otras numerosas condiciones que pueden aumentar su concentración.

- Transferrina deficiente de carbohidratos (CDT): es una isoforma de la transferrina, glicoproteína sintetizada en el hígado encargada del transporte de hierro. La transferrina contiene dos lugares de N-glicosilación, con diferentes residuos de ácido siálico terminales. En los individuos no bebedores, la tetrasialotransferrina constituye la isoforma circulante predominante (70-80%), seguida de la penta- y trisialotransferrina (15-20%). La CDT, definida como las isoformas di-, mono- y asialotransferrina, supone menos del 2%. El consumo excesivo de alcohol produce CDT, no ocurriendo lo mismo con el consumo puntual o moderado. Así pues, se puede emplear este metabolito como biomarcador del consumo crónico de alcohol, siendo su sensibilidad y especificidad moderada. Cuando se trata de monitorizar la abstinencia y detectar recaídas, la especificidad aumenta hasta un 100% y la sensibilidad hasta un 90% porque su vida media es de 14-17 días. Así la concentración de CDT disminuye progresivamente hasta alcanzar los niveles de referencia 2 semanas después de la última ingesta alcohólica. Al contrario de lo descrito con la GGT, la concentración de CDT no aumenta con medicamentos ni en pacientes con enfermedad hepática de etiología no alcohólica. El método de referencia para la detección de CDT es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con columna de intercambio aniónico.

ETIL GLUCURÓNIDO EN ORINA COMO MARCADOR DEL CONSUMO DE ALCOHOL

Como ya se ha mencionado en los apartados anteriores, el etil glucurónido (etil β -D-6-glucurónido, EtG) es un metabolito directo del etanol, formado en el hígado por la conjugación de este último con ácido glucurónico. Esta reacción de fase II forma parte del metabolismo no oxidativo del etanol y está catalizada por una enzima localizada en la membrana mitocondrial: la UDP-glucosiltransferasa. En las células hepáticas también ocurre la conjugación de etanol con sulfato por una sulfotransferasa para formar etil sulfato (EtS). La fracción del etanol ingerido que sufre estas reacciones enzimáticas es muy pequeña (0,1%) y, tanto el EtG como el EtS se eliminan vía renal.

La matriz en la que se suelen detectar ambos metabolitos como marcadores de la ingesta alcohólica es la orina, aunque hay casos en los que se miden en sangre total o suero. Se ha visto que la concentración en suero es superior a la de la sangre total. Es por ello que resulta imprescindible tener en cuenta la muestra estudiada a la hora de comparar resultados.

La diferencia promedio entre el pico de concentración de etanol tras la ingesta alcohólica y el de EtG y EtS es de aproximadamente 2-3 horas y 1-2 horas respectivamente. Se han reportado amplias variaciones interindividuales en las concentraciones plasmáticas máximas de ambos conjugados de etanol y que no hay correlación entre éstos y los niveles de etanol en sangre. Además, diversos estudios han visto que la eliminación de EtG y EtS ocurre de forma

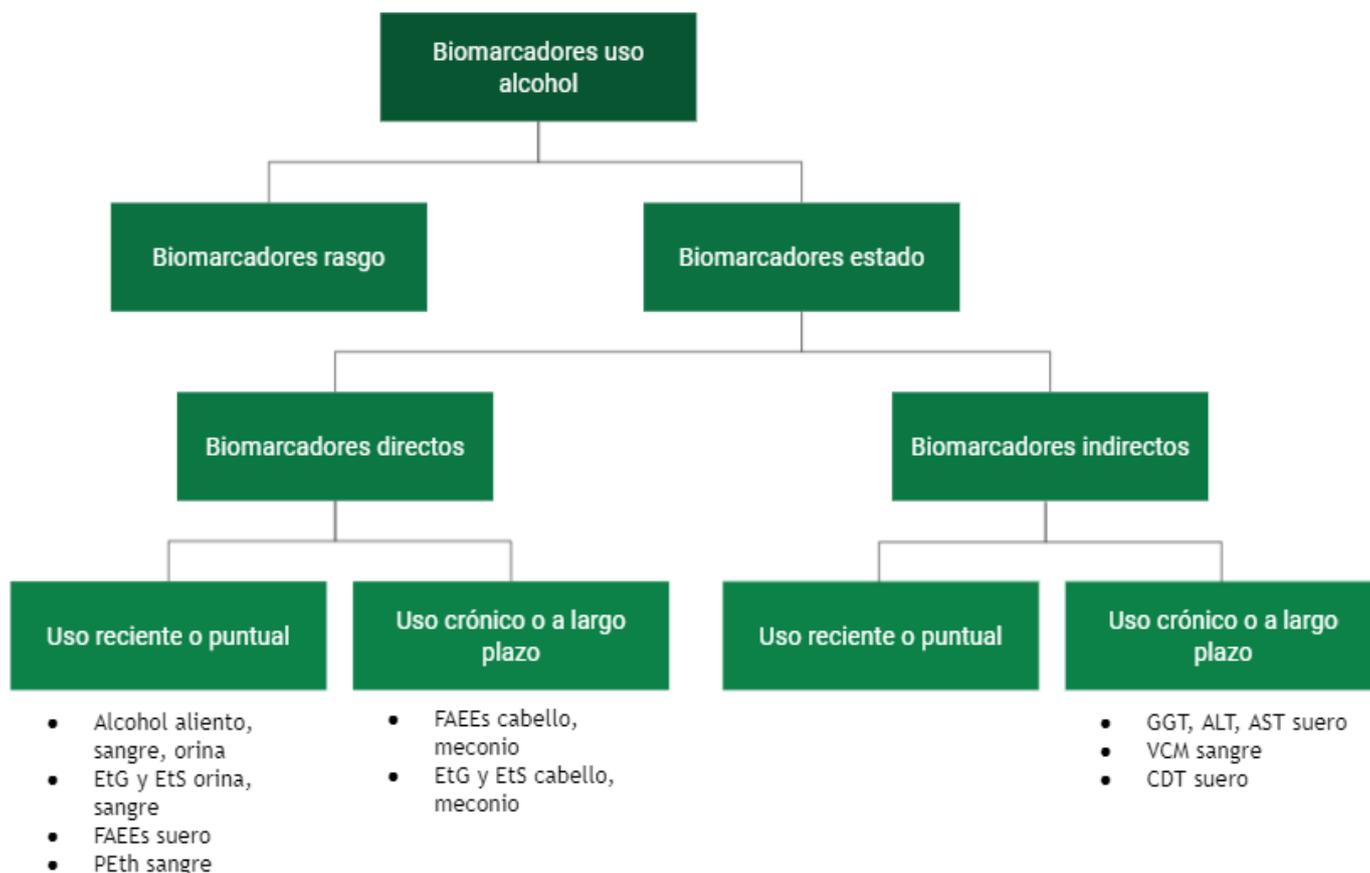


Figura 4. Clasificación de los marcadores de consumo de alcohol. Adaptado de: Mateus Rodríguez JA, 2019.

exponencial, con una vida media de entre 2 y 4 horas. La ventana de detección de EtG en orina es de hasta 72-90 horas.

No se han observado diferencias en la tasa de eliminación de EtG y EtS entre una población sana y personas alcohólicas. Sin embargo, en pacientes con patología renal sí que se ha descrito una disminución en este parámetro, así como mayores valores de concentración sanguínea. Además de la enfermedad renal, el sexo, la edad, el cannabis y el consumo de etanol en los meses previos, son factores que afectan a la concentración de EtG. Sin embargo, la raza, el tabaco, el índice de masa corporal, la cirrosis, la cantidad de agua corporal o la edad de comienzo de consumo de alcohol de forma regular, no son variables que influyan. Tampoco se han descrito interferencias del consumo de otras drogas con la tasa de síntesis de EtG y EtS. Esto podría deberse a que, si bien es cierto que las drogas son conjugadas por las mismas enzimas que el etanol y esta competición podría disminuir la cantidad de EtG formado, su consumo induciría la síntesis enzimática, suponiendo este hecho un incremento en el EtG sintetizado.

También se han estudiado los efectos de la diuresis en la concentración de EtG, siendo posible disminuir la proporción de EtG en orina bebiendo grandes cantidades de agua. Para superar este inconveniente se ha propuesto la expresión de como ratio de EtG y creatinina.

- **Estabilidad**

Se ha visto que el EtG es un marcador bastante estable. Muestras de orina almacenadas a 4°C durante 5 semanas no han reportado pérdidas en la concentración de este metabolito. Sin embargo, si la conservación se hace a temperatura ambiente sí que se observa un aumento en los niveles de EtG debido a la evaporación de agua. Lo que no se ha descrito a ninguna temperatura es la descomposición del analito en orina.

Estudios con muestras de tejido con resultado EtG positivo dejadas a temperatura ambiente muestran un descenso en la concentración del metabolito a lo largo del tiempo, pero no formación post mortem. Así pues, un resultado positivo tras un fallecimiento indica un consumo de etanol previo a la muerte. Muchos trabajos forenses se centran en la detección de EtG post mortem, al ser las mediciones de etanol en este entorno difíciles de interpretar.

- **Puntos de corte**

Aunque diferentes estudios muestran que establecer el punto de corte en 100-200 µg/L y 100-110 µg/L para EtG y EtS en orina respectivamente permite detectar la ingesta de alcohol, en la rutina clínica se usa 500 µg/L para disminuir los falsos positivos.

En plasma no existen suficientes estudios actualmente como para establecer los valores de corte más adecuados.

- **Tiempos de detección**

Numerosos estudios han intentado concretar la ventana de tiempo en la que el EtG permanece detectable en la orina de individuos que han consumido alcohol. Los resultados obtenidos han sido muy heterogéneos en función de la dosis ingerida. Así, se detecta hasta las 24-48 horas post ingestas

en individuos con dosis de alcohol de 0,1-0,85 g por kilogramo de peso corporal, mientras que en sujetos con intoxicación etílica el resultado de EtG urinario era positivo hasta las 40-130 horas.

Falsos positivos y falsos negativos

A pesar de la estabilidad del EtG en orina, se han descrito tanto falsos positivos como falsos negativos debido a la contaminación bacteriana de dicha muestra. La presencia de *Escherichia coli* y *Clostridium sordelli* conlleva una disminución de la concentración de EtG pero no de EtS, demostrándose la sensibilidad del primero a la hidrólisis bacteriana. Al ser *E. coli* el patógeno urinario más común, hay un alto riesgo de encontrar resultados falsamente disminuidos de EtG. Por este motivo, para la obtención de resultados más fiables, se recomienda la medición de EtG combinado con EtS. Otra medida preventiva propuesta es la adición de fluoruro al contenedor de recogida de la muestra y la congelación de la misma con el fin de prevenir el crecimiento bacteriano.

Otros estudios han descrito la posible síntesis de EtG en presencia de etanol en orinas contaminadas por *E. coli*. La formación de etanol puede ocurrir por contaminación y fermentación microbiana, aumentando el riesgo en sujetos diabéticos con glucosuria. La formación de EtG post recogida no siempre se evita con conservantes a base de fluoruro o el almacenamiento de la muestra a 4°C, recomendándose también en estos casos la medición simultánea de EtS con EtG.

Además, encontramos en la bibliografía otras situaciones de falsos positivos de EtG en orina. Entre ellas tendríamos el uso de enjuagues bucales que contienen alcohol, el uso de geles hidroalcohólicos para la limpieza de manos, el consumo de cervezas “sin alcohol” (en algunas partes del mundo pueden tener hasta un 0,5% de etanol y aun así ser consideradas bebidas no alcohólicas), la ingesta de chucrut o de plátanos maduros.

- **Métodos de determinación**

Se han publicado varios métodos para la determinación de la concentración de EtG, siendo la cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC/MS) la técnica más empleada por mostrar la especificidad y sensibilidad más elevada además de medir tanto EtG como EtS simultáneamente. La LC-MS se usa tanto en muestras de orina como de sangre total, suero, meconio, saliva y cabello.

Un estudio de comparación de cinco métodos LC-MS para la medición de EtG y EtS en orina concluyó que la extracción en fase sólida seguida de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) tenía la mejor selectividad y sensibilidad y que, por ello, debía adoptarse como método de referencia en esta matriz.

La casa comercial Thermo Fisher Scientific ha desarrollado y comercializado un método para el análisis de EtG en orina por enzimoimmunoanálisis: el ensayo de etil glucuronido DRI®⁴. Este ensayo presenta “valores discriminatorios de 500 ng/ml y 1000 ng/ml” y emplea “anticuerpos específicos que permiten detectar el etil glucuronido sin que reaccionen de forma cruzada significativamente con otros compuestos

de glucurónido. Se basa en la competencia entre una droga marcada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la droga libre presente en la muestra de orina por un número determinado de sitios de unión del anticuerpo específico." Para comprobar la exactitud del ensayo DRI y la posible reactividad cruzada de los anticuerpos anti EtG con otros constituyentes de la orina y otras drogas, se analizaron 184 muestras con el ensayo de etil glucurónido DRI en los modos cualitativo y semicuantitativo, y los resultados se compararon con los del método LC/MS/MS. Tanto en el modo cualitativo como en el semicuantitativo, la coincidencia positiva entre las muestras analizadas con el ensayo de EtG DRI y la LC/MS/MS fue del 96%. A pesar de esto, actualmente este ensayo ofrece únicamente un resultado analítico cualitativo preliminar. Es necesario utilizar un método alternativo más específico con el fin de confirmar el resultado analítico. Los métodos de confirmación recomendados son la cromatografía de gases/ cromatografía líquida espectrometría de masas (GC/MS) y la cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS).

- **Utilidad y aplicaciones**

La determinación de EtG tiene utilidad en una amplia variedad de escenarios clínicos y forenses.

- Una de estas situaciones sería la monitorización de la abstinencia de sujetos incluidos en programas de desintoxicación. Diversos estudios han reportado la dificultad de seguir a estos pacientes usando la medición directa del etanol en sangre u orina debido al corto periodo de tiempo que este marcador permanece positivo después del consumo alcohólico. Por ello en muchos de estos programas los únicos datos que tiene el clínico sobre el consumo de alcohol de los participantes proceden de un cuestionario previo: el AUDIT⁵ (Test de Identificación de los Trastornos Debidos al Consumo de Alcohol). Esta prueba desarrollada por la OMS se emplea como método simple de screening del consumo excesivo de alcohol y como apoyo en la evaluación breve. También proporciona un marco de trabajo para ayudar a los bebedores con consumo perjudicial o de riesgo a reducir o cesar el consumo de etanol. El AUDIT consta de 10 preguntas con 5 opciones de respuesta cada una. Cada respuesta tiene una puntuación entre 0 y 4, sumándose al finalizar la encuesta todas ellas. La OMS establece "puntuaciones totales iguales o mayores a 8 como indicadores de consumo de riesgo y consumo perjudicial, así como de una posible dependencia de alcohol." Trabajos de comparación de los niveles de EtG en orina y los resultados del AUDIT reportan falta de sinceridad al contestar y subestimación del consumo.
- La determinación de EtG en el ámbito clínico también resulta de gran utilidad en el seguimiento de pacientes hepatotransplantados. A menudo el trasplante de hígado para el tratamiento de la enfermedad hepática derivada del consumo nocivo de alcohol es controvertido ya que entre un 20 y un 25% de los pacientes vuelven a abusar después de la cirugía. La abstinencia es un requisito necesario para permanecer en la lista de espera de trasplantes, pero resulta muy difícil de evaluar con los marcadores indirectos tradicionales (GGT y CDT)

porque éstos pueden verse afectados por la propia patología hepática. Además, en el caso de emplear el propio etanol como marcador de abstinencia los pacientes saben que es suficiente con dejar de beber 24-36 horas antes de la prueba para arrojar resultados negativos. Al tratarse el EtG y el EtS de metabolitos que se sintetizan en el hígado, podría pensarse que los sujetos con enfermedades hepáticas muy avanzadas tienen su producción reducida. Sin embargo, como se trata de vías metabólicas secundarias del etanol, no se ha encontrado evidencia de que ésto suceda. En la revisión realizada por Katharina Stauer y Michel Yegles en 2016⁶ se hizo una comparativa de la sensibilidad y especificidad de los marcadores de consumo de etanol en pacientes con trasplante de hígado (Tabla 1). Arrojando las mejores cifras conjuntas de sensibilidad y especificidad el EtG en orina: 89.3% y 98.9% respectivamente. La especificidad de la CDT resultó también muy buena (98.6%) pero la sensibilidad muy baja (25%). Si se establece el punto de corte por debajo de 55 U/l, ocurre al contrario con la GGT: alta sensibilidad (85.7%) pero baja especificidad (39.7%).

- Otra aplicación propuesta para EtG es la identificación de recién nacidos con riesgo de sufrir espectro alcohólico fetal o síndrome alcohólico fetal mediante su detección en meconio. Se ha visto que la determinación de los niveles de EtG y FAEEs en esta muestra aumenta la fiabilidad de los resultados y disminuye los falsos positivos y negativos.

Table 1 Biomarkers for alcohol consumption used in the liver transplant setting

Biomarker	Biological compartment	Window of detection	Confounding factors	Cut off	Sensitivity	Specificity	Number of patients	Ref.
Indirect markers								
GGT	Serum	-	Liver disease	-	49.6	83.9	558	[33]
				< 55 U/l	85.7	39.7	141	[17]
MCV	Serum	-	Hematological diseases, vitamin deficiencies	< 94 fL	75.0	55.7	141	[17]
AST	Serum	-	Liver disease, muscle alterations	< 35 U/L	67.9	56.3	141	[17]
ALT	Serum	-	Liver disease	< 50 U/L	29.6	76.2	141	[17]
%CDT	Serum	1-2 wk	Hyperbilirubinemia, liver cirrhosis/disease, smoking, sepsis, anorexia	≥ 2.5%	52.7	87.8	558	[33]
			nervosa, airway diseases, rare genetic variants, transferrin levels	> 2.6%	25.0	98.6	141	[17]
				> 2.6%	-	-	88	[18]
Direct markers								
Breath alcohol	Exhalation air	10-12 h	Alcohol containing mouth wash	≥ 0.01 g/L	-	-	18	[6]
EtOH	Serum	10-12 h	Unknown	≥ 0.1 g/kg	- ¹	- ¹	141	[17]
				-	-	-	41	[55]
MeOH	Serum	up to 48 h	Unknown	≥ 5 mg/L	22.2	99.3	141	[17]
				≥ 1.5 mg/L	-	-	41	[55]
EtG	Urine	up to 80 h	Heavily impaired kidney function, high amounts of baker's yeast/sauerkraut, alcohol containing mouthwash, storage above 4 °C before measurement	≥ 0.5 mg/L	-	-	18	[6]
					89.3	98.9	141	[17]
EtG	Hair	up to 6 mo	EtG containing hair treatment, heavily impaired kidney function	≥ 7 pg/mg	76.0	91.0	88	[18]

¹No sensitivity/specificity calculated, since only 1 of 141 patients had elevated EtOH. In the case of CDT, only studies using the HPLC method for determination of %CDT are reported. - not reported in the cited manuscript. GGT: Gamma-glutamyl transferase; MCV: Mean corpuscular volume; AST: Aspartate amino transferase; ALT: Alanine amino transferase; CDT: Carbohydrate deficient transferrin; EtOH: Ethanol; HPLC: High-performance liquid chromatography; MeOH: Methanol; EtG: Ethyl glucuronide.

Tabla 1. Comparativa de los biomarcadores de consumo de alcohol usados en los trasplantes de hígado. Tomado de: Stauffer K *et al*, 2016.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

- Organización Mundial de la Salud. Alcohol [Internet]. Ginebra: OMS [consultado 31 octubre 2021]. Disponible en: https://www.who.int/healthtopics/alcohol#tab=tab_1 y <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/alcohol>
- Ministerio de Sanidad. Gobierno de España [Internet]. España: Ministerio de Sanidad [consultado 30 octubre 2021]. Disponible en: <https://estilosdevidasaludable.sanidad.gob.es/consumo/home.htm> y <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/revPromocion/Prevencion/alcohol/>
- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones. Alcohol, Tobacco and illegal drugs in Spain. 2021 Annual Report [Internet]. España: OEDA; 2021 [consultado 30 octubre 2021]. Disponible en: https://pnsd.sanidad.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/informesEstadisticas/pdf/2021_Summary_report_Informe_OEDA.pdf
- Instrucciones del ensayo de etil glucurónido DRI@ [Internet] Thermo Fisher Scientific [consultado 2 noviembre 2021]. Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS->

[Assets/CDD/Package-Inserts/10011227-DRI-Ethyl-Glucuronide-Assay-ES.pdf](#)

- Babor TF, Higgins-Biddle JC, Saunders JB, Monteiro MG. AUDIT Cuestionario de Identificación de los Trastornos debidos al Consumo de Alcohol. España: OMS; 2001. Disponible en: https://www.who.int/substance_abuse/activities/en/AUDITManualSpanish.pdf
- Stauffer K, Yegles M. Biomarkers for detection of alcohol consumption in liver transplantation. World J Gastroenterol. 2016;22(14):3725-34.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Birková A, Hubková B, Čížmárová B, Bolerázka B. Current View on the Mechanisms of Alcohol-Mediated Toxicity. International Journal of Molecular Sciences [Internet]. 2021; 22(18): 9686.
- Caudevilla Gállico F. Drogas: conceptos generales, epidemiología y valoración del consumo. En: Curso del Colegio Oficial de Médicos de Segovia. Segovia: Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria Ediciones; 2008. Disponible en: <http://www.comsegovia.com/pdf/cursos/tallerdrogas/Cur>

[so%20Drogodependencias/Drogas.%20conceptos%20generales.%20epidemiologia%20y%20valoracion%20del%20consumo.pdf](#)

- Cederbaum AI. Alcohol metabolism. Clin Liver Dis. 2012; 16(4): 667-85.
- Evora Soldo S. Alcohol y fisiología humana: Capítulo 2- Donde todo comienza: el alcohol en el aparato digestivo [Internet]. Elsevier; 2017 [consultado 1 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/alcohol-y-fisiologia-humana-capitulo-2-donde-todo-comienza-el-alcohol-en-el-aparato-digestivo>
- González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. Alteraciones nutricionales. Síndrome metabólico. Alcoholismo. Vitaminas. 3ª ed. Barcelona: Elsevier España; 2019. p. 217-225.
- Heier C, Xie H, Zimmermann R. Nonoxidative ethanol metabolism in humans — from biomarkers to bioactive lipids. IUBMB Life. 2016; 68 (12): 916-923.
- Mateus Rodríguez JA. Biomarcadores del consumo de alcohol y su relación con la dosis. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona; 2019.
- Ministerio de Sanidad. Gobierno de España [Internet]. España: Ministerio de Sanidad [consultado 30 octubre 2021]. Disponible en: <https://estilosdevidasaludable.sanidad.gob.es/consumo/home.htm> y <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/revPromocion/Prevencion/alcohol/>
- Morán Chorro I, Baldirà Martínez de Irujo J, Marruecos - Sant L, Nogué Xarau S. Toxicología clínica [Internet]. Madrid: Difusión Jurídica y Temas de Actualidad S.A.; 2011 [revisado 2011; consultado 31 octubre 2021]. Disponible en: http://www.fetoc.es/asistencia/Toxicologia_clinica_libro.pdf
- Organización Mundial de la Salud. Alcohol [Internet]. Ginebra: OMS [consultado 31 octubre 2021]. Disponible en: https://www.who.int/health-topics/alcohol#tab=tab_1 y <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/alcohol>
- Parra Robert M, Vega Toribio V. Análisis de drogas de abuso en el laboratorio clínico. Ed. Cont. Lab. Clin. 2020; 50: 118-133.
- Walsham NE, Sherwood RA. Ethyl glucuronide. Ann Clin Biochem. 2012; 49(2): 110-7.

PATOLOGÍA SUPRARRENAL

Autores: Ilenia Liria González, Silvia Díaz Díaz, Adrián González Quintana

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

Palabras clave: Hipotálamo-Hipófisis, Cortisol, Cushing, Addison

EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL

• Hipotálamo-Hipófisis

El hipotálamo es una región del cerebro formado por varios núcleos neuronales con naturaleza secretora. El hipotálamo produce distintas hormonas denominadas factores hipotalámicos que actúan sobre la hipófisis regulando su producción hormonal. La hipófisis es una glándula situada en el interior de una estructura ósea denominada silla turca, en la base del cerebro, que ejerce un control sobre las funciones de varias glándulas endocrinas (tiroides, suprarrenales y gónadas) y que tiene una amplia gama de actividades fisiológicas. Está formada por dos lóbulos que difieren entre sí desde una perspectiva anatómica, embriológica y funcional:

- Adenohipófisis o hipófisis anterior formada por las células endocrinas en las que se van a liberar hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona del crecimiento (GH), prolactina, tirotropina (TSH), hormona luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH).
- Neurohipófisis o hipófisis posterior formada por las terminaciones nerviosas procedentes de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo que van a producir oxitocina y vasopresina.

Ambas, hipotálamo-hipófisis están conectadas por el tallo hipofisario y forman un sistema encargado de mantener la regulación y el equilibrio de distintos ejes hormonales implicados en funciones básicas del organismo como el crecimiento somático, la maduración gonadal, la adaptación al estrés, la lactancia o la liberación de hormonas tiroideas¹.

El mecanismo por el que se mantiene este equilibrio está definido por la acción estimulante o inhibitoria que ejerce el hipotálamo sobre la hipófisis a través de la liberación de factores hipotalámicos. Estas a su vez son reguladas por un proceso de retroalimentación por las hormonas finales generadas en el tejido diana de cada una de las hormonas hipofisarias o a través de ritmos pulsátiles circadianos o por influencia del sistema nervioso central.

• Glándula suprarrenal

Las glándulas suprarrenales comprenden dos formaciones situadas en el polo superior de los riñones. Cada glándula suprarrenal está compuesta por dos estructuras embriológicamente distintas:

- Médula (origen neuroectodérmico): parte interna de la glándula suprarrenal, encargada de la síntesis de catecolaminas, implicadas en la regulación de la tensión arterial, la frecuencia cardíaca y otras actividades fisiológicas reguladas por el sistema nervioso simpático.

- Corteza (origen mesodérmico): parte externa de la glándula suprarrenal encargada de la síntesis de hormonas esteroideas. En ella podemos diferenciar a su vez tres regiones:

1. Zona fascicular, implicada en la síntesis de corticoesteroides, hormonas similares a cortisona, entre las que encontramos el cortisol.
2. Zona glomerular, donde se sintetizan los mineralocorticoides, especialmente la aldosterona, implicada en el equilibrio hidroelectrolítico y en la regulación de la presión arterial.
3. Zona reticular, encargada de la producción de hormonas sexuales, en concreto de andrógenos adrenales.

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) tiene como finalidad generar un ritmo basal de cortisol y una respuesta de cortisol a una amplia variedad de estímulos, denominados como respuesta a estrés¹. En este eje la hormona hipotalámica implicada va a ser la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que va a ser la encargada de actuar como factor hipotalámico sobre la hipófisis. A nivel hipofisario, esta CRH va a estimular la producción de hormona adrenocorticotropa (ACTH) de forma pulsátil: causando concentraciones máximas antes del despertar y disminuyendo según progresa el día. De esta forma, como respuesta a estímulos externos tales como la hipoglucemia, la ansiedad, el estrés o la depresión, se va a producir la liberación hipotalámica de CRH y como consecuencia la adenohipófisis liberará ACTH. La principal función de la ACTH, es la de actuar sobre la zona fascicular de las glándulas suprarrenales, favoreciendo la síntesis de cortisol.

Además, también actúa sobre la zona reticular de modo que puede afectar en menor medida a la síntesis de DHEAS y de androstendiona. Este cortisol, ejerce una retroalimentación negativa sobre la síntesis de ACTH a nivel hipofisario e hipotalámico².

RITMO CIRCADIANO

Los ritmos circadianos son cambios físicos, mentales y conductuales que siguen un ciclo de 24 horas.

La actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal sigue un ritmo circadiano en condiciones normales de vigilia y sueño. Este ritmo circadiano está determinado por el núcleo supraquiasmático hipotalámico que impulsa la liberación de CRH que conduce a la producción de ACTH y de cortisol³.

Las concentraciones plasmáticas de CRH, ACTH y cortisol presentan niveles bajos al inicio del sueño y comienzan a aumentar durante la madrugada (entre las 2h y las 4h) alcanzando su máximo entre las 6 y las 8 de la mañana y

disminuyen durante el día siendo mínimas a las 20h y durante la noche³.

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal juega un papel muy importante en el mantenimiento de los estados de alerta y en la modulación del sueño³. Este ritmo circadiano puede alterarse por numerosos factores, muchos de ellos relacionados con el insomnio, el estrés físico o emocional, la fiebre, las alteraciones nutricionales, la depresión, la ansiedad o el uso de medicamentos.

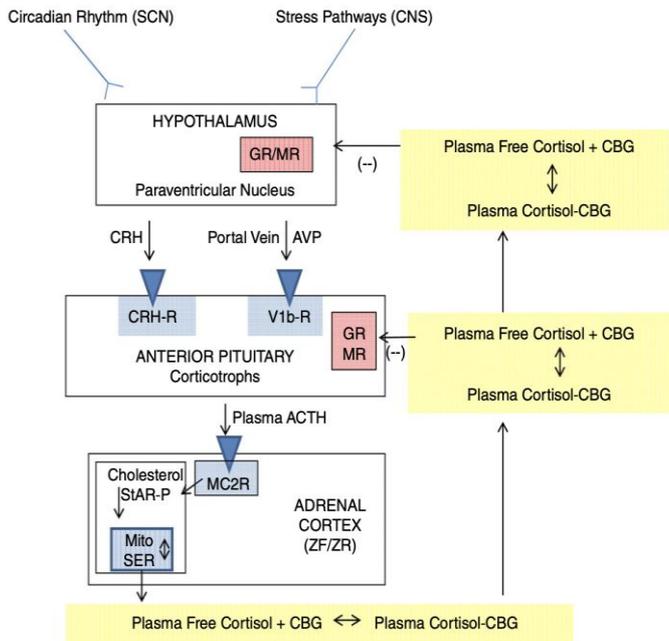


Figura 1. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA). Tomado de: Hershel and Carroll, 2014.

PATOLOGÍAS DEL EJE CORTICOSUPRARRENAL

Los trastornos del eje corticosuprarrenal pueden conllevar la secreción insuficiente o excesiva de una hormona. Una secreción hormonal anómala puede deberse a un problema con la propia glándula suprarrenal (trastorno primario) o a un problema en la hipófisis (secundario) o bien, en el hipotálamo (terciario) de forma que la glándula suprarrenal esté recibiendo un estímulo inapropiado.

Podemos dividir las patologías en 3 grandes grupos:

1. Trastornos por hipersecreción, de forma que la secreción hormonal es excesiva y aumentan en exceso los niveles de hormona suprarrenal circulante:
 - Secreción excesiva de glucocorticoides: síndrome de Cushing.
 - Secreción excesiva de aldosterona: Hiperaldosteronismo.
 - Secreción excesiva de catecolaminas: feocromocitoma.
 - Secreción excesiva de andrógenos: virilización.

2. Trastornos por hiposecreción cuando la secreción hormonal es insuficiente:
 - Secreción insuficiente de glucocorticoides: enfermedad de Addison.
 - Secreción insuficiente de aldosterona: Hipoaldosteronismo.
3. Trastornos por defectos en la síntesis de esteroides. En este caso, se produce un bloqueo en algunas etapas de la vía de síntesis de esteroides que conlleva a que se acumulen determinados metabolitos intermediarios. La hiperplasia suprarrenal congénita engloba todos los trastornos hereditarios de la esteroidogénesis suprarrenal. En función del déficit enzimático se conocen siete formas clínicas siendo la más frecuente el déficit de 21-hidroxilasa⁴.

En este capítulo nos centraremos en los trastornos por exceso y por defecto de los glucocorticoides. Finalmente, a través de un caso clínico haremos un breve resumen de los trastornos por defectos en la síntesis de esteroides, en concreto, del déficit de 21-hidroxilasa.

SECRECIÓN EXCESIVA DE GLUCOCORTICOIDES- HIPERCORTISOLISMO

El síndrome de Cushing, también conocido como hipercortisolismo, es una entidad clínica producida por la exposición prolongada a glucocorticoides. Según las causas, el síndrome de Cushing puede clasificarse como endógeno o exógeno. De acuerdo con su mecanismo de producción, el síndrome de Cushing endógeno puede clasificarse a su vez como ACTH-dependiente o ACTH-independiente. De esta forma, el nombre de enfermedad de Cushing se reserva para la secreción hipofisaria autónoma de ACTH, generalmente, a partir de un tumor hipofisario y el de síndrome de Cushing, para el resto de las etiologías, incluyendo el Cushing de origen suprarrenal.

● **Prevalencia y etiología**

La causa más frecuente del síndrome de Cushing es la iatrogénica debida principalmente a la prescripción frecuente de glucocorticoides. Existe una gran subestimación en el registro de estos casos de Cushing lo cual conlleva a que la verdadera incidencia del síndrome de Cushing sea desconocida. El síndrome de Cushing endógeno es una entidad muy rara teniendo una incidencia de 2 a 4 casos/millón de habitantes/año. La enfermedad de Cushing es la causa más frecuente de Cushing de origen endógeno, siendo unas 5 o 6 veces más frecuentes que el síndrome de Cushing suprarrenal. Presenta una incidencia entre 1,2 y 2,4 casos/millón de habitantes/año. Se considera que la incidencia puede ser mayor debido a los incidentalomas suprarrenales que originan síndromes de Cushing subclínicos y la subestimación de los causados por secreción ectópica de ACTH. Aparece en mayor proporción en las mujeres, con una incidencia de 3-5:1 respecto a los varones. De esta forma, las mujeres presentan una frecuencia 3-8 veces mayor para desarrollar enfermedad de Cushing y 3-5 veces mayor para padecer un síndrome de Cushing suprarrenal. La edad de diagnóstico varía también dependiendo de la etiología⁵.

Las causas que producen el síndrome de Cushing pueden clasificarse en²:

1. ACTH independientes en las que los niveles de cortisol son elevados sin estimulación por la ACTH. Encontramos a su vez dos tipos:
 - Síndrome de Cushing endógeno ACTH-independiente, en el que la glándula suprarrenal produce cortisol de forma autónoma sin estímulo de la ACTH debido a una hiperfunción suprarrenal.
 - Síndrome de Cushing exógeno ACTH-independiente, es la causa más común de síndrome de Cushing, debida a la administración de corticoides como la prednisona o la hidrocortisona a dosis altas para el tratamiento de otras patologías. Así mismo, pacientes que sufren estrés por enfermedades, traumatismos o que se encuentran ingresados en unidades de cuidados intensivos suelen presentar niveles elevados de cortisol.
2. ACTH dependientes. En este caso, las dos fuentes de producción de ACTH excesiva pueden ser:
 - Hiperfunción hipofisaria debida a un adenoma productor de ACTH.
 - Producción ectópica de ACTH y/o CRH por algunos tumores de pulmón, páncreas o neuroendocrinos productores de ACTH.

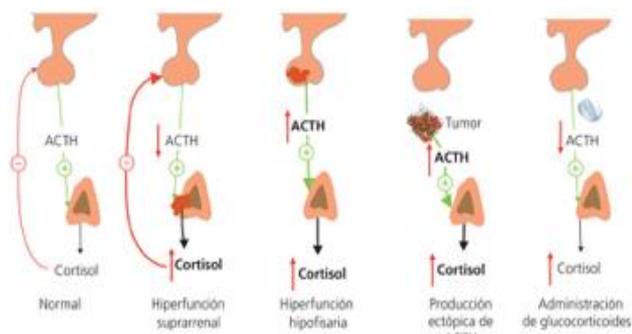


Figura 2. Representación esquemática de las causas de hiperfuncionamiento. Tomado de: González Hernández A, 2019.

• Clínica

La presentación clínica de los pacientes con síndrome de Cushing es variada. El diagnóstico debe comenzar con la anamnesis, que recoja la posible administración de glucocorticoides exógenos, y la exploración del paciente. Los pacientes con Síndrome de Cushing presentan una gran variedad de signos y síntomas que pueden dividirse en aquellos que son poco frecuentes y poco específicos y los que permiten diferenciar el síndrome de Cushing debido a que son altamente específicos⁶.

Los rasgos específicos de los pacientes con síndrome de Cushing son la obesidad de tipo central, con cara de luna llena, estrías en la piel de color rojizo principalmente sobre el tórax y el abdomen, pérdida de masa muscular, atrofia dérmica y hematomas. Entre los rasgos más inespecíficos que pueden hacer sospechar de la presencia de un síndrome de Cushing encontramos la ganancia de peso reciente junto a la aparición de alteraciones del metabolismo glucídico y/o

a la hipertensión arterial resistente a tratamiento⁶. Así mismo, se trata de pacientes que presentan una mayor tendencia a infecciones y a mala curación de las heridas (debido a los efectos inmunosupresores del cortisol). En mujeres, cabe destacar que debido al exceso de andrógenos podemos encontrar hirsutismo, acné y alteraciones menstruales.

Debemos tener en cuenta que existen casos de Cushing con una producción elevada de ACTH y/o CRH que pueden enmascarar las características clínicas del hiperfuncionamiento. En estos casos, debido a los niveles altos de ACTH podemos encontrar pacientes con hiperpigmentación de la piel, alteraciones hidroelectrolíticas como la hipopotasemia, pérdida de peso, anorexia y astenia⁶.

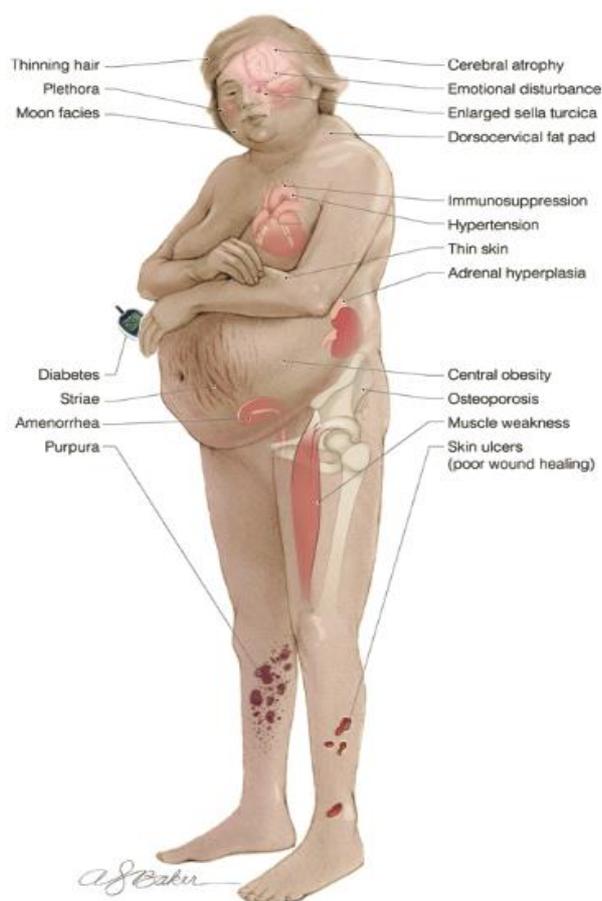


Figura 3. Presentación clínica del síndrome de Cushing. Tomado de: Russell *et al*, 2017.

SECRECIÓN INSUFICIENTE DE GLUCOCORTICOIDES-HIPOCORTISOLISMO

• Prevalencia y etiología

La insuficiencia suprarrenal es un trastorno caracterizado por la incapacidad de la glándula suprarrenal para mantener una secreción hormonal adecuada tanto basal como en situaciones de estrés⁸. Se caracteriza por un déficit de glucocorticoides, al que puede asociarse un déficit de mineralocorticoides y/o andrógenos suprarrenales⁸.

La insuficiencia suprarrenal puede deberse a alteraciones a cualquier nivel del eje hipotálamo-hipófisis-glándula

suprarrenal. Dependiendo del nivel donde se encuentre el trastorno encontramos tres tipos de insuficiencia suprarrenal:

1. **Primaria:** Cuando el trastorno se localiza a nivel de la glándula suprarrenal. En estos casos el daño de la glándula suprarrenal puede estar ocasionado por:
 - Destrucción autoinmune de la glándula asociado en muchas ocasiones a otras enfermedades autoinmunes, tales como el hipotiroidismo o hipertiroidismo autoinmune, anemia perniciosa, vitíligo, entre otras. En estos casos constituye el denominado síndrome poliglandular autoinmune.
 - Destrucción de la glándula suprarrenal por infecciones (tuberculosis, sepsis meningocócica, VIH), enfermedades de depósito (sarcoidosis, amiloidosis, hemocromatosis)⁸ tumores o hemorragias.
 - Problemas genéticos como la hiperplasia suprarrenal congénita.
2. **Secundaria:** Existe un problema hipofisario que afecta a la secreción de ACTH. Dentro de este grupo, encontramos la causa más frecuente de insuficiencia suprarrenal que es el tratamiento crónico con corticoides a altas dosis para otras patologías (asma, EPOC, enfermedad inflamatoria crónica, entre otras) en los que la administración continuada de corticoides conlleva a la supresión de la producción de ACTH. Además de esta causa, encontramos también los tumores cerebrales, principalmente de hipotálamo e hipófisis, que impiden la secreción de ACTH, así como, el tratamiento por cirugía o radioterapia.
3. **Terciaria:** Debido a un trastorno hipotalámico se afecta la secreción de CRH o por corticoterapia crónica.

La prevalencia de la insuficiencia suprarrenal de origen primario se estima en 35-60 casos/millón de habitantes, mientras que la prevalencia de la insuficiencia suprarrenal de origen secundario se estima en 150-280 casos/millón de habitantes⁸.

• Clínica

Los síntomas y signos clínicos asociados a la insuficiencia suprarrenal dependen del grado de afectación de la glándula, de la preservación de la producción de mineralocorticoides, del nivel de estrés y de la preservación el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal. Normalmente, presenta una instauración lenta que suele ponerse de manifiesto cuando el paciente se somete a situaciones de estrés físico. La clínica que presentan los pacientes varía dependiendo de la etiología que produce la insuficiencia suprarrenal.

- Los pacientes con insuficiencia suprarrenal primaria suelen presentar síntomas derivados del déficit de hormonas suprarrenales. El defecto puede ser total o parcial dependiendo si afecta a glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos o solo a uno de ellos. El déficit aislado de mineralocorticoides o de andrógenos son entidades raras, siendo más común el fallo adrenal total o el déficit aislado de glucocorticoides⁷. En estos pacientes, la manifestación clínica suele producirse como un shock adrenal. Debido a la ausencia de aldosterona se pierde la capacidad de promover la

retención de sodio y las respuestas vasoconstrictoras. Además, la deficiencia de glucocorticoides puede contribuir a la hipotensión causando una disminución de la respuesta vascular a la angiotensina II y la noradrenalina, disminuyendo la síntesis de renina y aumentando la producción de prostaciclina.

Otras características clínicas que pueden presentar estos pacientes es la hiperpigmentación cutánea, debido a la hipersecreción crónica de ACTH. Además, suelen presentar debilidad, fatiga pérdida de peso y alteraciones hidroelectrolíticas.

- En el caso de los pacientes con insuficiencia suprarrenal secundaria y terciaria los síntomas están asociados al déficit de glucocorticoides⁸. En estos pacientes se dan una serie de características clínicas observadas en la insuficiencia suprarrenal primaria. Estos incluyen debilidad, fatiga, dolor muscular, articular y síntomas psiquiátricos. Otros síntomas que pueden presentar estos pacientes son dolor de cabeza, pérdida de visión aguda o reducción del campo visual. Estos pacientes no presentan hiperpigmentación debido a que no tienen incrementada la secreción de ACTH. Además, debido a la pérdida repentina de la secreción de ACTH pueden presentar hipotensión y shock.

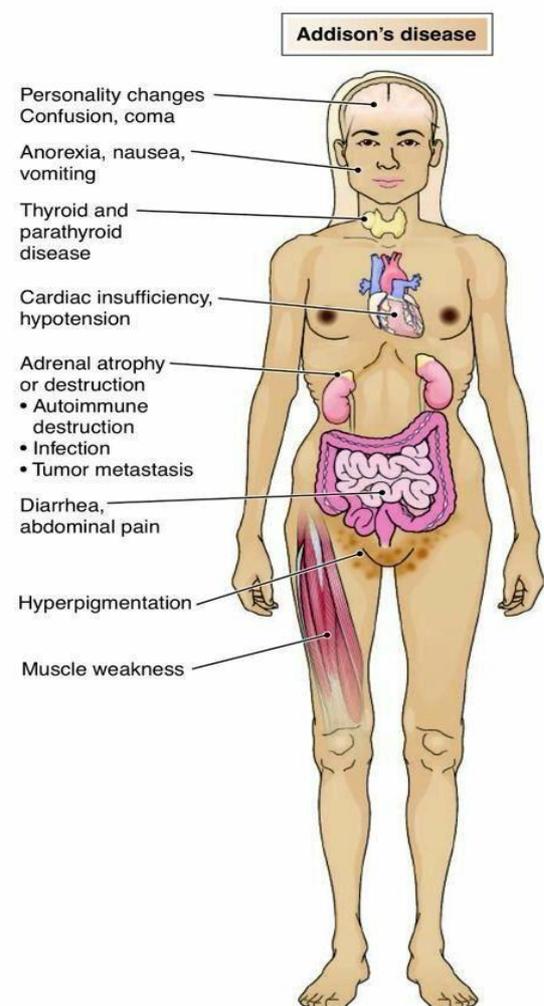


Figura 4. Presentación clínica de la enfermedad de Addison. Tomado de: Pinterest.

ESTUDIO DEL EJE CORTICOSUPRARRENAL

Debido a que la expresión clínica no suele tener suficiente especificidad es necesario basar el diagnóstico definitivo en pruebas bioquímicas y técnicas de imagen. En los casos de diagnóstico de síndrome de Cushing debemos tener en cuenta que estos pueden cursar con hiposecreción intermitente de cortisol de forma que si existe una alta sospecha clínica y los resultados de laboratorio son negativos es necesario repetir la valoración⁶.

Debido a las características del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal si queremos evaluar los estados de hipercortisolismo o de hipocortisolismo, es necesario basar las pruebas de laboratorio en la demostración de alteraciones de las hormonas implicadas en él.

● Pruebas basales

1. ACTH: La ACTH es una hormona peptídica que se origina inicialmente a partir de la POMC (propiomelanocortina) que en la hipófisis anterior se hidroliza a pro-ACTH y β -lipotropina. La pro-ACTH se transforma en ACTH que se libera intermitentemente a la circulación. En este proceso se producirá también α -MSH que tiene relación con el aspecto hiperpigmentado de los pacientes con Addison.
 - Función biológica: Estimula la secreción de cortisol y otros esteroides suprarrenales.
 - Tipo de muestra y extracción: Plasma EDTA con hielo con extracción única antes de las 9:00 am.
 - Interpretación: Diagnóstico diferencial de los estados de hipo o hiposecreción de cortisol. El conocimiento de sus niveles es imprescindible para realizar el diagnóstico diferencial de los estados de hiper e hiposecreción de cortisol. Debe valorarse conjuntamente con los niveles de cortisol. En un paciente con hipercortisolismo que presente una ACTH suprimida puede indicar un Cushing independiente de ACTH por diversas causas (adenoma suprarrenal, carcinoma suprarrenal, administración de corticoides exógenos...). En los casos de insuficiencia suprarrenal, la determinación de ACTH tiene utilidad limitada para el diagnóstico de insuficiencia suprarrenal debido a que pueden encontrarse concentraciones bajas, normales o elevadas dependiendo del nivel donde se localice el defecto responsable. Puede ser de utilidad en los casos de insuficiencia suprarrenal primaria en la que los niveles de cortisol se encuentran entre 3 y 15 $\mu\text{g}/\text{dl}$, en los que una concentración de ACTH elevada ayudaría a confirmar la existencia de una insuficiencia suprarrenal y nos permitiría señalar a una afectación de la glándula⁸.
2. Cortisol: El cortisol es una hormona esteroidea o glucocorticoide producida por la glándula suprarrenal. Denominada la "hormona del estrés" debido a que sus niveles aumentan durante los estados de alarma con el fin de restablecer la homeostasis. La secreción de cortisol oscila según el ritmo circadiano de tal forma que aumenta durante la mañana y disminuye a lo largo del día alcanzando su valor mínimo alrededor de la medianoche³.

- Función biológica: El cortisol posee numerosas acciones biológicas en el organismo. Entre ellas, podemos destacar su función como glucocorticoide estimulando la gluconeogénesis a partir de la descomposición de las proteínas y las grasas. Además, presenta acción mineralocorticoide participando en la homeostasis del agua y los electrolitos. Por último, destacar su acción como inmunomodulador suprimiendo la acción del sistema inmunitario⁹.
- Tipo de muestra y extracción: La determinación del cortisol puede realizarse en suero, orina de 24 horas y saliva. Debido al ritmo circadiano de secreción de cortisol los valores de referencia suelen estar referidos a las extracciones realizadas entre las 8:00 y las 9:00, no siendo extrapolables a otras horas del día. Por ello, es necesario conocer la hora exacta de extracción para poder llevar a cabo una interpretación correcta de los valores obtenidos.
- Interpretación:
 - Valores elevados: Síndrome de Cushing, tumores adrenales, estrés, embarazo (tercer trimestre).
 - Valores disminuidos: Enfermedad de Addison (hipoproducción), hiperplasia suprarrenal congénita e insuficiencias adrenales secundarias.

● Pruebas funcionales

1. Test de estimulación
 - Test de estimulación con CRH: Empleado para diferenciar el origen hipofisario o ectópico del síndrome de Cushing ACTH dependiente. Esta prueba funcional se fundamenta en que la mayoría de los adenomas hipofisarios productores de ACTH responden a la administración de CRH secretando ACTH, mientras que los tumores con secreción ectópica de ACTH o los tumores suprarrenales productores de cortisol en principio carecen de receptor específico y no responden al estímulo. Esta prueba funcional consiste en la administración de CRH en bolo intravenoso y extracción de sangre basal y los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos para determinar cortisol y ACTH. Un aumento de ACTH superior al 50% del valor basal o un cortisol superior al 20% del basal indican un origen hipofisario. Sin embargo, si no se produce respuesta indica una secreción ectópica de ACTH o un síndrome de Cushing ACTH-independiente.

SERVICIO DE BIOQUIMICA

PRUEBAS FUNCIONALES

TEST DE CRH

ACTH 0 min (Test de CRH)	4	pg/mL
ACTH 15 min (tras CRH)	17	pg/mL
ACTH 30 min (tras CRH)	14	pg/mL
ACTH 60 min (tras CRH)	8	pg/mL
ACTH 90 min (tras CRH)	8	pg/mL
ACTH 120 min (tras CRH)	3	pg/mL
Cortisol 0 min (Test de CRH)	9.38	µg/dL
Cortisol 15 min (tras CRH)	17.50	µg/dL
Cortisol 30 min (tras CRH)	20.40	µg/dL
Cortisol 60 min (tras CRH)	16.90	µg/dL
Cortisol 90 min (tras CRH)	15.20	µg/dL
Cortisol 120 min (tras CRH)	12.10	µg/dL

Respuesta positiva que orienta a secreción de origen hipofisario (Incremento >50% para ACTH y >20% para Cortisol) con una especificidad del 88-93% y una sensibilidad del 91-100%.

Figura 5. Ejemplo de test de estimulación de CRH. Se observa una respuesta positiva (incremento >50% para ACTH y > 20% para Cortisol) que orienta hacia un origen hipofisario. Elaboración propia.

- Test de hipoglucemia insulínica: Empleado para diagnóstico de insuficiencia suprarrenal y considerado como *gold standard*. Este test se fundamenta en determinar la respuesta de cortisol sérico a una hipoglucemia inducida tras la administración de insulina. La hipoglucemia es un potente estímulo para la secreción de ACTH y CRH y en consecuencia para la síntesis de cortisol. Para considerar que el estímulo ha sido válido es necesario lograr una concentración plasmática de glucosa inferior a 40 mg/dl y debe acompañarse de los signos y síntomas clásicos de hipoglucemia. En esta prueba niveles de cortisol > 18 µg/dl o >20 µg/dl según determinados autores confirman que no existe alteración del eje HHA⁸. Esta prueba funcional conlleva riesgos de complicaciones graves limitando su uso principalmente en pacientes con enfermedad cardiovascular o cerebrovascular, en pacientes con hipertensión grave, embarazadas y en pacientes mayores de 60 años.
- Test de estimulación con ACTH: Conocido como Test de Synacthen y empleado en el diagnóstico de la insuficiencia suprarrenal. Esta prueba está basada en determinar la respuesta de las glándulas suprarrenales a la administración exógena de ACTH mediante la determinación de cortisol. Para ello, se extrae una muestra de cortisol basal y a los 60 minutos tras la administración de ACTH sintética en bolo intravenoso. Se considera que la respuesta es adecuada cuando el cortisol estimulado es > 18 µg/dl o cuando aumenta 9 unidades respecto al basal, siempre que este sea > 5 ng/dl. Se considera que los valores de cortisol estimulado <16 µg/dl son sugestivos de insuficiencia suprarrenal. En pacientes con una insuficiencia suprarrenal primaria es frecuente encontrar una respuesta plana. Esto es debido a que estos pacientes en situación basal tienen estimulada al máximo la secreción de cortisol debido a que presentan niveles muy elevados de ACTH. En casos de diagnóstico de

defectos de la esteroidogénesis puede solicitarse también además de la determinación de cortisol, la determinación de 17-OH-progesterona, dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS), androstendiona y progesterona.

2. Test de supresión

- Test con dexametasona (DXM): La dexametasona es un glucocorticoide sintético que no interfiere en la determinación de cortisol pero que mimetiza su acción, inhibiendo por retroalimentación la producción de ACTH y CRH y consecuentemente la de cortisol. Los resultados de la prueba pueden verse alterados por todas aquellas situaciones o circunstancias que pueden afectar a la absorción o metabolización de la DXM. La ingesta de alcohol y fármacos como la fenitoína, el fenobarbital o la carbamacepina interfieren por inducción del citocromo implicado en la metabolización hepática de DXM generando falsos positivos. Otras causas de falsos positivos son el alcoholismo, la obesidad, la enfermedad aguda intercurrente y la depresión grave. Existen diferentes modalidades dependiendo de la dosis de dexametasona empleada y de su combinación o no con CRH.
 - Supresión nocturna con DXM 1 mg: Es uno de los más empleados en la práctica habitual, conocido como test de Nugent. En este, se administra por la noche, aproximadamente a las 23h, de forma oral una pastilla de 1 mg de DXM y al día siguiente sobre las 8-9h se realiza la extracción para determinar cortisol. La administración de una dosis suprafisiológica de DXM suprime la secreción de ACTH y de cortisol en sujetos sanos. En pacientes con síndrome de Cushing no se produce esa supresión tras una dosis baja de DXM. El punto de corte más utilizado para el cortisol post-DXM es 1.8 µg/dL (S=95% y E=80%).
 - Supresión con dosis altas de DXM 8 mg: En este caso, se considera que la frenación es correcta si el cortisol post-DXM es inferior al 50% del valor basal.
 - Prueba de DXM-CRH: Esta prueba nos permite diferenciar los pacientes con síndrome de Cushing de los pacientes con pseudo-Cushing. La prueba consiste en realizar una frenación con 2mg/día durante 2 días con DXM y 2 horas después de la última dosis de DXM realizar un test de estimulación con CRH. Los pacientes que presenten un síndrome de Cushing a los 15 minutos de la inyección de CRH suelen presentar cortisoles en plasma superior a 1.4 µg/dl mientras que los pacientes con pseudo-Cushing presentarán cifras inferiores⁶.
 - Existen otras modalidades de las pruebas de supresión con DXM en las cuales varía la dosis de DXM, el tiempo de supresión o la vía de administración. Todas estas pruebas están basadas en la supresión relativa de la concentración plasmática y/o urinaria del cortisol en respuesta a la administración de dexametasona. Este tipo de prueba funcional en función de la dosis nos permitirá diferenciar el síndrome de Cushing dependiente de

ACTH puesto que la supresión estará presente en aquellos casos de enfermedad de Cushing de origen hipofisario, pero no en los casos de Cushing ectópico⁸.

- Test con metopirona: Basado en el efecto inhibido de la metopirona sobre la 11- β -hidroxilasa, la enzima responsable de convertir 11-deoxicortisol en cortisol. En sujetos sanos, la reducción en la síntesis del cortisol inducida por la metopirona conduce a un aumento de ACTH que estimula la síntesis de esteroides previos al bloqueo. Se considera normal unos valores de cortisol <5 $\mu\text{g/dl}$.

Tras comentar las pruebas implicadas en el estudio del eje hipotálamo hipófisis suprarrenal vamos a estudiar cómo se emplea cada una de las pruebas en el diagnóstico del síndrome de Cushing y en la insuficiencia suprarrenal.

• Diagnóstico del síndrome de Cushing

Las fases del diagnóstico bioquímico del síndrome de Cushing se clasifican en:

1. Pruebas de cribado: El objetivo es seleccionar aquellos pacientes potenciales de padecer el síndrome de Cushing. Dentro de este grupo encontramos aquellos con obesidad de tipo central especialmente si además presentan diabetes tipo 2, hipertensión arterial, dislipemia, hiperandrogenismo y alteraciones menstruales. Para realizar el cribado se recurre a las siguientes determinaciones:
 - Cortisol libre urinario: La prueba recomendada para la detección inicial del síndrome de Cushing es la determinación de cortisol libre en orina de 24h debido a que no está influido por el ritmo circadiano e informa de la cantidad de cortisol producida al día. Su rendimiento diagnóstico es alto (90%), siempre que la recogida de orina sea correcta y que la función renal sea normal. El 95% de pacientes con Síndrome de Cushing tiene un incremento de la excreción de cortisol en orina. No obstante, una de cada 4 determinaciones de cortisol libre en orina es normal en los pacientes con síndrome de Cushing y en los casos con Cushing leve o episódico. Por ello, es necesario realizar tres determinaciones de cortisol libre en orina para que este tenga valor diagnóstico. En líneas generales, valores >300 $\mu\text{g}/24\text{h}$ confirmarían el diagnóstico mientras que valores <100 $\mu\text{g}/24\text{h}$ lo descartarían. Los valores comprendidos entre 100-300 hacen necesario repetir la prueba o recurrir a otras pruebas para establecer el diagnóstico.
 - Cortisol en saliva nocturno: La determinación de cortisol en saliva de muestra nocturna se ha propuesto como método alternativo de cribado a la recogida de orina de 24h. La determinación de cortisol en saliva supone un método cómodo y práctico debido a que el paciente puede tomar la muestra en casa evitando así situaciones de estrés generadas por el pinchazo o por tener que acudir al hospital. La muestra debe recogerse por la noche, aproximadamente a las 23 h, y entregarse al día siguiente en el laboratorio. El problema principal de esta determinación es la falta de consenso para la interpretación del mismo debido a que hay una gran

dispersión en los resultados obtenidos en los individuos normales, así como, en el valor a partir del cual se establece la sospecha de síndrome de Cushing.

- Supresión con DXM nocturna 1 mg o test de Nugent del que hemos hablado anteriormente.
2. Pruebas de confirmación: Tras obtener un resultado positivo en una prueba de cribado es necesario confirmar el diagnóstico y establecer la causa o el origen del mismo. En esta fase de confirmación se lleva a cabo la repetición de la determinación de cortisol libre en orina de 24 h, además de la determinación de cortisol plasmático (basal y en algunos casos tras supresión con DXM) o salival. Después de la confirmación será necesario llevar a cabo una evaluación de la dependencia o no de ACTH y el diagnóstico diferencial del síndrome de Cushing dependiente de ACTH.
 - Evaluación de la dependencia de ACTH: El objetivo es diferenciar aquellos pacientes en los que el síndrome de Cushing cursa con valores detectables o elevados de ACTH (ACTH-dependientes) de aquellos que son ACTH independientes y por tanto de origen suprarrenal. Para evaluar la dependencia o no de ACTH se realiza la determinación de ACTH en plasma. Encontraremos tres situaciones⁸:
 - Concentraciones de ACTH > 20 pg/ml establecen un síndrome de Cushing ACTH dependiente⁸.
 - Concentraciones de ACTH < 10 pg/ml⁸ concluyen un síndrome ACTH independiente.
 - Valores de ACTH entre 10 y 20 pg/ml⁸ (5- 15 pg/ml, según otros autores¹⁰) requieren de la realización de pruebas funcionales como el test de estimulación con CRH. Una falta de respuesta al test indica que nos encontramos ante un síndrome de Cushing ACTH-independiente.
 - Diagnóstico diferencial del síndrome de Cushing dependiente de ACTH: Una vez establecida la dependencia de ACTH es necesario determinar si la producción de ACTH es de origen hipofisario, por lo que estaríamos ante un caso de enfermedad de Cushing, o por el contrario la producción tiene un origen ectópico. En estos casos la determinación basal de ACTH no permite distinguir ambas situaciones debido a que existe un solapamiento entre las concentraciones plasmáticas de ACTH que se producen. En estos casos, es necesario recurrir al uso de pruebas funcionales entre las que encontramos el test de estimulación con CRH y las pruebas de supresión con dosis altas de DXM.
 3. Pruebas de imagen: Además del diagnóstico bioquímico es necesario confirmar mediante técnicas de imagen las alteraciones en la glándula suprarrenal, en la hipófisis o en el hipotálamo que supongan el origen del trastorno.

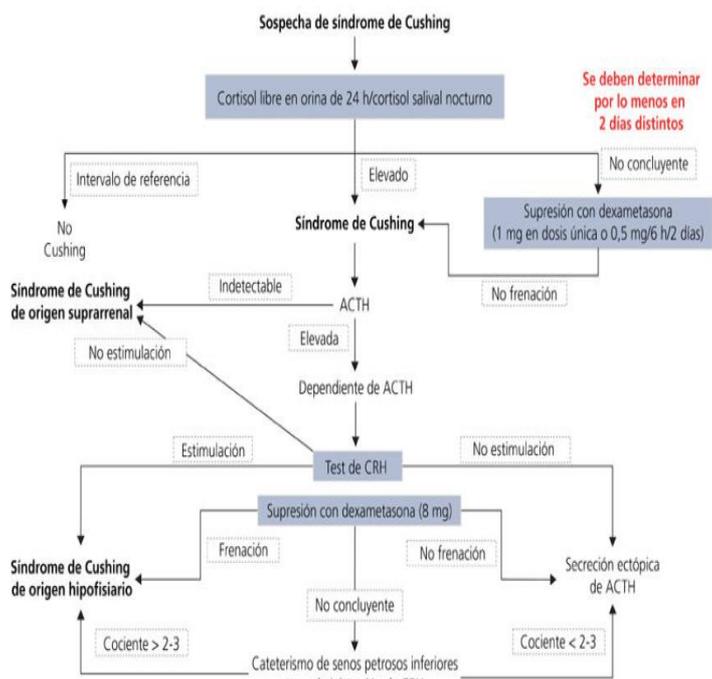


Figura 6. Algoritmo diagnóstico ante la sospecha de síndrome de Cushing. Tomado de: González Hernández A, 2019.

• Diagnóstico de la insuficiencia suprarrenal

El diagnóstico de un paciente con sospecha de insuficiencia suprarrenal incluye tres etapas:

1. Confirmación de la existencia de insuficiencia suprarrenal: Se realiza con determinaciones hormonales basales siendo la medición de cortisol sérico basal la primera determinación a realizar. Podemos encontrar diferentes situaciones:
 - Un valor de cortisol plasmático $<3 \mu\text{g/dl}$ confirma el diagnóstico de insuficiencia suprarrenal mientras que valores superiores a $15 \mu\text{g/dl}$ permiten descartar con una alta seguridad la insuficiencia suprarrenal.
 - Valores de cortisol entre 3 y $5 \mu\text{g/dl}$ son altamente sugestivos de insuficiencia, aunque encontramos una pequeña proporción de personas sanas que pueden encontrarse en este rango.
 - Valores de cortisol entre 10 y $15 \mu\text{g/dl}$ son muy sugestivos de normalidad del eje HHA. No obstante, un pequeño porcentaje de pacientes con insuficiencia adrenal pueden presentar estos niveles de cortisol.

Como podemos observar, los pacientes con valores de cortisol entre 3 y $15 \mu\text{g/dl}$ son aquellos en los que necesitamos diferenciar si nos encontramos ante una insuficiencia suprarrenal o ante un sujeto sano. En estos pacientes en los que los niveles de cortisol son indeterminados y existe sospecha clínica de insuficiencia suprarrenal será necesario recurrir a pruebas funcionales que nos permitan confirmar o descartar el diagnóstico de insuficiencia suprarrenal. Entre estas pruebas encontramos:

- Test de hipoglucemia insulínica.
- Test de Synacthen.

- Otras pruebas como el test de metopirona, el test de glucagón o el test de estímulo con ACTH para determinación de cortisol en saliva.

2. Identificación del nivel del eje HHA donde se localiza el defecto responsable (diagnóstico de localización): Los valores plasmáticos de ACTH son el elemento clave para diferenciar entre insuficiencia suprarrenal primaria y secundaria. La hiperpigmentación mucocutánea característica de los pacientes con insuficiencia suprarrenal primaria es debida a la elevación de ACTH y no está presente en aquellos pacientes que presenten una insuficiencia suprarrenal de origen secundario. En los pacientes con insuficiencia suprarrenal primaria, la pérdida de los mecanismos hipofisarios de retroalimentación conlleva a un incremento en la secreción de ACTH mientras que en los casos de insuficiencia adrenal secundaria las concentraciones de ACTH suelen encontrarse en rangos bajos o normales. Además, en pacientes con insuficiencia suprarrenal primaria solemos encontrar también déficit de mineralocorticoides, que conllevan a una hiperpotasemia e hiponatremia, ausente en los casos de insuficiencia suprarrenal secundaria.

3. Diagnóstico etiológico: Una vez establecido el diagnóstico de insuficiencia suprarrenal es necesario identificar la causa responsable. En el caso de determinar la existencia de una insuficiencia suprarrenal primaria será necesario determinar si la causa de la destrucción de la glándula es debida a trastornos adquiridos (adrenalitis autoinmune, infecciones...), a enfermedades genéticas (hipoplasia suprarrenal congénita o adrenoleucodistrofia) o iatrogénica (fármacos o cirugía). En el caso de determinar una insuficiencia suprarrenal secundaria debemos determinar si nos encontramos ante un déficit de ACTH aislado o asociado a otras deficiencias de hormonas hipofisarias.

CASOS CLÍNICOS

• Caso clínico 1:

1. Exposición del caso: Mujer de 57 años con antecedentes personales de enfermedad renal crónica secundaria a poliquistosis hepatorenal. Remitida a Endocrinología desde Nefrología por hallazgo de incidentaloma adrenal en TC y por cortisol libre en orina de $414 \mu\text{g}/24\text{h}$ (VR: $[13.0 - 75.0] \mu\text{g}/24\text{h}$).
2. Anamnesis y exploración física:
 - Obesidad ($P= 70 \text{ kg}$; $\text{IMC}= 31.9 \text{ kg}/\text{m}^2$).
 - Distribución centrípeta de la grasa.
 - Cara redondeada, estrías rojo vinosas en abdomen y signos de atrofia muscular.
3. Algoritmo diagnóstico: Se solicita al laboratorio la determinación basal de cortisol y ACTH plasmática, cortisol en orina de 24h y test de supresión con DXM nocturna 1 mg. Los resultados obtenidos son los siguientes:

- Cortisol plasmático = 27 µg/dl (VR: [6.00 - 18.00] µg/dl).
- ACTH= 55 pg/ml (VR: [4.70 - 48.80] pg/ml).
- Cortisol urinario= 239 µg/24h. (VR: [13.0 - 75.0] µg/24h)
- Cortisol tras supresión con DXM (1mg) = 9.4 µg/dl.
- El punto de corte para el cortisol post-DXM es 1.8 µg/dL (S=95% y E=80%). No supresión.

Ante los datos obtenidos podemos cercar el diagnóstico a dos condiciones: 1) Enfermedad de Cushing por hiperfunción hipofisaria o 2) Síndrome de Cushing por secreción ectópica de ACTH. Para diferenciar entre ambas situaciones se decide realizar un test de supresión con DXM a altas dosis (8 mg). En la mayoría de los adenomas hipofisarios corticotropos la administración de dosis elevadas de DXM produce una frenación parcial de la secreción de ACTH mientras que los tumores ectópicos suelen ser más resistentes a dicha supresión. En este test se obtiene una supresión mayor al 50%. Se realiza una RMN que detecta una lesión mixta en la hemihipófisis derecha.

4. Diagnóstico: La paciente es diagnosticada de enfermedad de Cushing (ACTH dependiente y de origen hipofisario).
5. Tratamiento: Se realiza abordaje trasnasal y resección del adenoma tras el cual la paciente refiere mejoría clínica. Disminuye el cortisol libre en orina, pero sin presentar hipocortisolismo ni disminución de las cifras de ACTH. Por ello, se realiza un test de supresión con DXM nocturna con 8mg en el que no se observa una supresión adecuada. Se lleva a cabo una RMN que muestra ausencia radiológica de microadenoma hipofisario. Por ello, se determina que la paciente presenta además una secreción autónoma de cortisol.
6. Seguimiento: La paciente mantiene actualmente seguimiento sin tratamiento debido a su situación real y sin curación.

● Caso clínico 2

1. Exposición del caso: Mujer de 25 años que acude a urgencias por presentar un cuadro de astenia intensa, mialgias y pérdida de peso acompañada de dolor abdominal, náuseas y vómitos que le impiden realizar vida normal. La paciente refiere labilidad emocional con tendencia a la depresión.
2. Anamnesis y exploración física:
 - Destaca hiperpigmentación cutánea con coloración oscura de cicatrices y encías.
3. Algoritmo diagnóstico: Se solicita una analítica urgente en la que se objetiva hiperpotasemia, hiponatremia y alteración del perfil hepático. Debido a los resultados obtenidos la paciente ingresa en Medicina Interna para completar el estudio. Se solicita una analítica completa que incluye la determinación de basal de cortisol plasmático, ACTH, renina, aldosterona y ratio renina/aldosterona. Los resultados obtenidos son los siguientes:

- Cortisol plasmático = 0.81 ug/ml (VR: [6.00 - 18.00] ug/dl).
- ACTH > 1676 pg/ml (VR: [4.70 - 48.80] pg/ml).
- Aldosterona = 1.72 ng/dl

Posición supina/sedestación (VR: [1.17-23.6 ng/dl])

- Renina= 59 µUI/mL

Posición supina/sedestación (VR: [2.8-39.9 µUI/mL])

- Ratio Renina/Aldosterona = 0.03
4. Diagnóstico: Los datos obtenidos son compatibles con un cuadro de insuficiencia suprarrenal primaria con alteraciones iónicas secundarias. Se solicita la determinación de anticuerpos antiadrenales que resultan positivos. Por ello, podemos determinar que nos encontramos ante un caso de insuficiencia suprarrenal primaria autoinmune o Enfermedad de Addison. Se realiza RMN abdominal que descarta la existencia de otras alteraciones a nivel de la glándula suprarrenal.
 5. Tratamiento: Se comienza tratamiento intravenoso hormonal sustitutivo a altas dosis con buena respuesta.
 6. Seguimiento: La paciente mantiene seguimiento cada 6 meses con controles de potasio. Actualmente se encuentra en tratamiento con fludocortisona e hidroaltesona y ha experimentado mejoría de la hiperpigmentación.

● Caso clínico 3

1. Exposición del caso: Recién nacido prematuro de 7 días de edad a cargo de neonatos debido a su prematuridad. En la prueba de cribado neonatal se obtiene un resultado alterado para la 17-OH progesterona.
2. Anamnesis y exploración física:
 - Genitales femeninos.
 - No clitoromegalia.
 - No signos compatibles con virilización de genitales.
3. Algoritmo diagnóstico: Se solicita a laboratorio de manera urgente el perfil hormonal suprarrenal (Figura 7).
4. Diagnóstico: El perfil obtenido es compatible con hiperplasia suprarrenal congénita forma clásica probablemente por déficit de 21-hidroxilasa. Tras los resultados obtenidos se solicita análisis genético en el que se determina la mutación Gln318Stop en el gen CYP21A2, responsable del déficit de 21-hidroxilasa.
5. Tratamiento: Se inicia tratamiento con hidrocortisona, fludocortisona y aportes de NaCl.
6. Seguimiento: La paciente mantiene actualmente seguimiento y tratamiento.

Dentro de los trastornos de la glándula suprarrenal podemos encontrar los trastornos por defectos en la síntesis de esteroides conocidos como hiperplasia suprarrenal congénita (HSC). La HSC engloba todos los trastornos hereditarios de la esteroidogénesis suprarrenal del cortisol caracterizado porque se produce un bloqueo en alguna de las enzimas de la ruta de biosíntesis de esteroides. El déficit de cortisol es un hecho común a todas ellas y produce una

hiperestimulación de la corteza suprarrenal que es la causante de la elevación de los esteroides previo al bloque enzimático. Existen formas graves y moderadas en función del grado de afectación enzimática. En las formas graves o clásicas, el déficit es completo e inician sus manifestaciones en la época fetal como ocurre en el caso clínico que acabamos de presentar. En las formas moderadas o no clásicas, el déficit es parcial y se manifiestan clínicamente en la infancia y adolescencia e incluso pueden pasar desapercibidas hasta la edad adulta.

El déficit de la actividad de la enzima 21-hidroxilasa es la forma más frecuente de HSC. El sustrato de esta enzima es la 17-OH progesterona, por ello su determinación es clave en el diagnóstico de la HSC puesto que constituye un producto intermedio en la formación de cortisol, andrógenos y progesterona.

<input type="checkbox"/>	Pru	Prueba	Resultado	Unidades	Alarm.
<input type="checkbox"/>	ENAC	ENAC	ENAC		
<input type="checkbox"/>	TZD4A	Trazadora destino p612...	*		
<input type="checkbox"/>	IH	Índice de Hemólisis	41		▲
<input type="checkbox"/>	IL	Índice de Lipemia	20		
<input type="checkbox"/>	IC	Índice de Ictericia	14		▲
<input type="checkbox"/>	GLU	Glucosa	83	mg/dL	▲
<input type="checkbox"/>	CREA	Creatinina	0.62	mg/dL	
<input type="checkbox"/>	NA	Sodio	137	mEq/L	
<input type="checkbox"/>	K	Potasio	5.16	mEq/L	
<input type="checkbox"/>	CL	Cloro	100	mEq/L	
<input type="checkbox"/>	PROG	Progesterona	10.90	ng/mL	▲
<input type="checkbox"/>	COR	Cortisol	4.91	µg/dL	▼
<input type="checkbox"/>	DHEA	DHEA-S	741	µg/dL	▲
<input type="checkbox"/>	17HP	17-OH-Progesterona	68.70	ng/mL	▲
<input type="checkbox"/>	D4A	Delta 4 Androstenodiona	>10	ng/mL	

Figura 7. Resultados obtenidos del perfil hormonal suprarrenal compatible con hiperplasia suprarrenal congénita forma clásica. Elaboración propia.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. Araújo Castro E, Pascual Corrales E, Ortiz Flores AE, Escobar Morreale HF. Eje hipotálamo hipofisario. Fisiología y patología. *Medicine*. 2020;13(15):846-55. <https://doi.org/10.1016/j.med.2020.09.003>.
2. Hershel R, Carroll T. Cushing's syndrome: from physiological principles to diagnosis and clinical care. *J Physiol [Internet]* 2015; 593(3):493-506. Disponible en: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.282871>
3. Debono M, Ghobadi C, Rostami-Hodjegan A, Huatan H, Campbell MJ, Newell-Price J, et al. Modified-release hydrocortisone to provide circadian cortisol profiles.

JCEM [Internet] 2009;94(5):1548–54. Disponible en: <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2380>

4. Labarta Aizpún JI, De Arriba Muñoz A, Ferrer Lozano M. Hiperplasia suprarrenal congénita. *Protoc Diagn Pediatr*. 2019;1:141-56.
5. Lahera Vargas M, Varela da Costa C. Prevalencia, etiología y cuadro clínico del síndrome de Cushing. *Endocrinol Nutr [Internet]* 2009;56(1):32-39. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(09\)70191-3](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(09)70191-3).
6. Santos S, Santos E, Gaztambide S, Salvador J. Diagnóstico y diagnóstico diferencial del síndrome de Cushing. *Endocrinol Nutr*. 2009;56(2):71-84.
7. Grau G, Vela A, Rodríguez Estévez A, Rica I. Insuficiencia suprarrenal. *Protoc Diagn Ter Pediatr*. 2019;1:205-15.
8. De Miguel Novoa P, Vela ET, García NP, Rodríguez MM, Guerras IS, Martínez de Salinas Santamaría ML, et al. Guía para el diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia suprarrenal en el adulto. *Endocrinol Nutr*. 2014 Sep;61 Suppl 1:1-35.
9. Zefferino R, Di Gioia S, Conese, M. Molecular links between endocrine, nervous and immune system during chronic stress. *Brain Behav [Internet]* 2021;11:e01960. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/brb3.1960>.
10. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet*. 2006;367:1605-17.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- González A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 2ª ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
- Juszczak A, Morris D, Grossman A. Cushing's Syndrome. [Updated 2021 Jan 5]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext [Internet]*. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279088/>
- Lonser RR, Nieman L, Oldfield EH. Cushing's disease: pathobiology, diagnosis, and management. *J Neurosurg*. 2017 Feb;126(2):404-417. Disponible en: <https://doi.org/10.3171/2016.1.JNS152119>.
- Nieman L. Cushing's: Update on signs, symptoms and biochemical screening. *EJE [Internet]* 2015; 173: 33-38. Disponible en: [10.1530/EJE-15-0464](https://doi.org/10.1530/EJE-15-0464)
- Nieman, L. Diagnosis of Cushing's syndrome in the Modern Era. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 2018; 47:259-273.

ALTERACIONES NEUROLÓGICAS

Autores: Maialen Palomino Alonso; Alba Fernández del Pozo

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

Palabras clave: Líquido cefalorraquídeo, Sistema nervioso, Análisis bioquímico

INTRODUCCIÓN

● Anatomía del Sistema Nervioso

El sistema nervioso (SN) es una red compleja de estructuras especializadas que tienen como misión controlar y regular el funcionamiento de los órganos y sistemas corporales. Estructural o anatómicamente se divide en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP).

– Sistema Nervioso Central

Derivado del tubo neural y constituido por:

3. Encéfalo. Corresponde a la porción contenida en la cavidad craneal y se divide en: cerebro (hemisferios cerebrales), cerebelo y tronco del encéfalo (mesencéfalo, puente de Varolio/protuberancia y bulbo raquídeo).
4. Médula espinal, siendo la porción contenida en el conducto vertebral.

Las características especiales de las estructuras que comprenden el SNC hacen que requieran estar muy protegidas del medio externo. El encéfalo y la médula se encuentran protegidos dentro de estructuras óseas, pero además presentan tejido conectivo que rodea, preserva y mantiene el SNC dentro del cráneo y la columna vertebral, las meninges. Físicamente se pueden dividir en:

1. Paquimeninge, también conocida como duramadre, es la meninge más externa, gruesa, y resistente de todas.
2. Leptomeninge, constituida a su vez por dos hojas más finas y blandas:
 - Aracnoides: se adhiere a la superficie interna de la duramadre y presenta tabiques de tejido conectivo o trabéculas. Entre estas trabéculas se dispone el espacio subaracnoideo por donde circula el líquido cefalorraquídeo (LCR). El LCR llena los espacios internos y actúa como amortiguador y regulador de la homeostasis.
 - Piamadre: es la más interna y delgada, se adhiere íntimamente al encéfalo y a la médula espinal.

En relación con el LCR y con la protección del SNC, cabe hablar de la barrera hematoencefálica (BHE), una barrera fisiológica que separa el SNC y LCR de la sangre, gracias a sus componentes estructurales¹.

1. Células del endotelio vascular que presentan uniones estrechas.
2. Pericitos (células de Rouget o células murales), que son células contráctiles dispuestas alrededor de las células endoteliales.
3. Lámina o membrana basal de la pared capilar.

4. Pies terminales de los astrocitos perivasculares.
5. Microglía, que forma parte del sistema inmune.

Entre sus funciones está la de permitir el paso selectivo de moléculas e impedir el paso de microorganismos o sustancias no deseadas, además de metabolizar diversos compuestos. La misma eficiencia de la BHE para proteger el cerebro dificulta las intervenciones terapéuticas, debido a su baja permeabilidad a los fármacos.

– Sistema Nervioso Periférico

El SNP está compuesto por el conjunto de nervios y ganglios nerviosos.

1. Los nervios son haces de fibras nerviosas (axones) rodeados de tejido conectivo. Transportan información entre el SNC y la periferia corporal. Se pueden dividir tanto por su conexión con el SNC (craneales y espinales), como por la dirección de transmisión de la información (aférentes o sensitivos y eférentes o motores). Existen:
 - 12 pares de nervios craneales designados con números romanos. Hay algunos sensitivos, otros motores y otros mixtos.
 - 31 pares de nervios espinales o raquídeos. Cada nervio, exceptuando el cervical que es únicamente motor, está formado por una raíz dorsal o posterior (sensitiva) y una raíz ventral o anterior (motora).
2. Los ganglios nerviosos son estructuras que contienen agrupaciones de somas neuronales. Se dividen en:
 - Ganglios somáticos o raquídeos (ganglios de las raíces dorsales): se encuentran en la raíz posterior de los nervios raquídeos y son de naturaleza sensitiva.
 - Ganglios autónomos o vegetativos son de naturaleza motora, dividiéndose en simpáticos y parasimpáticos.

Hasta este punto se ha realizado una clasificación estructural del SN en SNC y SNP, pero funcionalmente puede dividirse a grandes rasgos en:

1. Sistema nervioso somático (voluntario), que se encarga de la detección de cambios en el medio externo y del control del movimiento.
2. Sistema nervioso autónomo (involuntario), detecta cambios en las vísceras y controla su actividad. Se divide a su vez de forma anatómica y funcional en sistema simpático y parasimpático.

● Fisiología del sistema nervioso

El SN está constituido por dos elementos celulares:

1. Las células gliales con función de soporte.
2. Las neuronas, responsables del procesamiento de la información. Constituyen la unidad funcional básica del SN, en concreto, el SNC presenta más de 100.000 millones de neuronas. Están constituidas fundamentalmente por tres regiones (Figura 1):
 - El soma, cuerpo principal de la neurona que contiene el núcleo y citoplasma.
 - Las dendritas, se trata de un número variable de prolongaciones ramificadas del soma que reciben los impulsos nerviosos.
 - Axón o fibra nerviosa, prolongación del soma por donde viaja la señal de salida, ramificándose para llegar a otras zonas tanto del SNC como de la periferia corporal.

Al final del axón hay unas estructuras especializadas, las terminaciones nerviosas (botones o pies terminales o sinápticos) a partir de las cuales la información se transfiere a las dendritas de otras neuronas (Figura 1).

El axón contiene una sustancia intracelular viscosa denominada axoplasma y puede estar rodeado o no de una vaina de mielina. La mielina es una estructura rica en lipoproteínas tales como colesterol, glicerofosfolípidos y esfingolípidos. Actúa como aislante eléctrico al disminuir el flujo iónico. La formación de la vaina es función de las células gliales, oligodendrocitos en el SNC y células de Schwann en el SNP, ya que son las encargadas de rodear el axón con su membrana. Las regiones entre las células gliales que no se encuentran aisladas se denominan nódulos de Ranvier (Figura 1) y es por donde se produce el flujo de iones, por lo que los potenciales de acción se transmiten de nódulo a nódulo estableciéndose una conducción saltatoria.

En relación con los potenciales de acción, la información se codifica y distribuye en las neuronas mediante cambios en la

carga eléctrica. La membrana celular de las neuronas se polariza, es decir que a través de ella se crea una diferencia de potencial eléctrico (potencial de membrana). En reposo, el potencial en el interior neuronal es de -70mV , pero cuando se estimula o excita una neurona por encima de cierto umbral se genera una breve inversión de la polaridad (despolarización) y se genera lo que se denomina potencial de acción. Los potenciales de acción excitan porciones adyacentes de la membrana y se propagan por el axón, invadiendo las terminaciones nerviosas.

La información recorre el SNC a través de potenciales de acción nerviosos denominados "impulsos nerviosos" a través de una sucesión de neuronas. La sinapsis es por tanto la conexión funcional entre las neuronas, pudiendo ser de dos tipos (Figura 1):

1. Eléctrica. Caracterizada por la presencia de canales fluidos abiertos que conducen la electricidad de una neurona a la siguiente. La mayoría presentan uniones en hendidura. Sin embargo, en el SNC hay solamente unos pocos ejemplos de este tipo de uniones, siendo más frecuentes en la transmisión de potenciales de acción entre fibras de músculo liso o cardíaco.
2. Química. Tipo predominante en la transmisión de impulsos nerviosos por el SNC. La primera neurona segrega un producto químico denominado neurotransmisor que actúa sobre las proteínas receptoras de la segunda neurona, excitando, inhibiendo o modificando su sensibilidad. Se conocen gran cantidad de sustancias químicas que actúan como transmisores sinápticos, pudiendo dividirse en dos tipos:
 - Transmisores de acción rápida y molécula pequeña (GABA, acetilcolina).
 - Neuropeptidos de mayor tamaño molecular y de acción lenta (oxitocina, angiotensina).

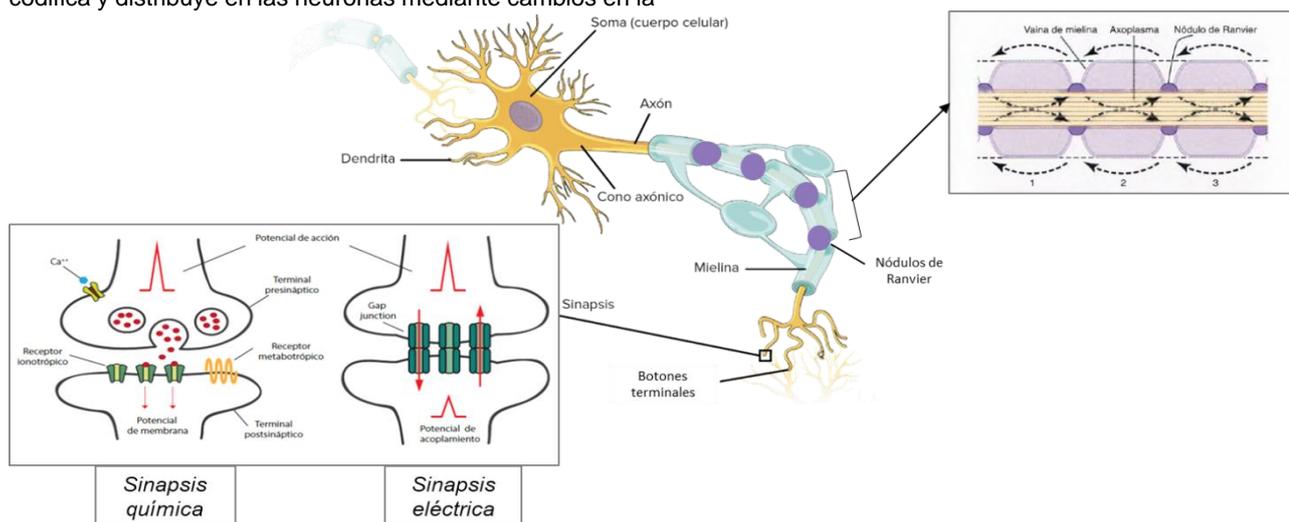


Figura 1. La neurona, como unidad funcional básica del sistema nervioso, está constituida de soma, dendritas y axón. Al final del axón hay unas estructuras especializadas, los botones terminales, donde se produce la sinapsis (químicas o eléctricas). El axón puede estar o no rodeado de una sustancia aislante rica en lipoproteínas, la mielina. En un axón mielinizado va a haber regiones donde no haya mielina, los nódulos de Ranvier, donde se produce el flujo de iones y se genera una conducción saltatoria más eficaz desde un nódulo al siguiente. Adaptado de: Función y estructura de la neurona [Internet]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org>; Yustres Diaz M, 2015; Fisiopatología de la esclerosis múltiple: qué sucede cuando se une el sistema nervioso central y el sistema inmunológico [Internet]. Disponible en: <https://infotiti.com/>.

El proceso de sinapsis química involucra una serie de etapas (Figura 2). Los neurotransmisores se encuentran dentro de vesículas en el terminal presináptico. A este nivel, la membrana presenta muchos canales de calcio dependientes de voltaje. Cuando el impulso nervioso llega al terminal, despolariza la membrana y se produce apertura de gran cantidad de canales de calcio, permitiendo la entrada de estos iones. Un aumento de los iones de calcio desencadena la fusión de las vesículas con la membrana presináptica, liberándose los neurotransmisores hacia la hendidura sináptica y finalmente uniéndose a los receptores de la membrana postsináptica, generando cambios en su potencial de membrana.

PATOLOGÍA INFECCIOSA E INFLAMATORIA

• Patología infecciosa

Las infecciones del SN pueden estar causadas por bacterias, virus, hongos, y en ocasiones protozoos o parásitos. Otro grupo de trastornos cerebrales agrupa aquellos producidos por proteínas anómalas (priones), son las denominadas encefalopatías espongiformes.

Aunque el encéfalo y la médula espinal están muy protegidos, puede haber diversas situaciones que faciliten la invasión por microorganismos, ocasionando consecuencias que pueden ser muy graves. Los vehículos de entrada de los

microorganismos al SNC son: sangre, directamente desde el exterior a través de fracturas o cirugía o bien a partir de estructuras cercanas infectadas (senos paranasales u oído medio).

La infección puede causar inflamación, mediada por citoquinas secretadas tanto por células del SNC (astrocitos, microglía) como por leucocitos y células *natural killer* circulantes. La inflamación se puede dar en diversas regiones del SNC: encéfalo (encefalitis) en la que los virus son la causa más frecuente; médula (mielitis); meninges (meningitis). Además, la contigüidad de las estructuras hace que se den cuadros mixtos como la encefalomielitis o meningoencefalitis. Este bloque se detallará posteriormente en el apartado de inflamación, como una de las causas de la misma.

Este tipo de infecciones no suelen quedar limitadas a una zona en concreto, sino que el microorganismo se disemina alcanzando todo el SNC. Sin embargo, hay algunos casos donde la infección queda localizada en una única región:

1. En forma de bolsa de pus, generalmente ocasionado por bacterias (*Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, y *Bacteroides fragilis*) y que según su ubicación se denominan como:
 - Empiemas: ubicados en espacios existentes en el cuerpo, como en los espacios entre las meninges. Por ejemplo, los empiemas subdurales entre duramadre y aracnoides.

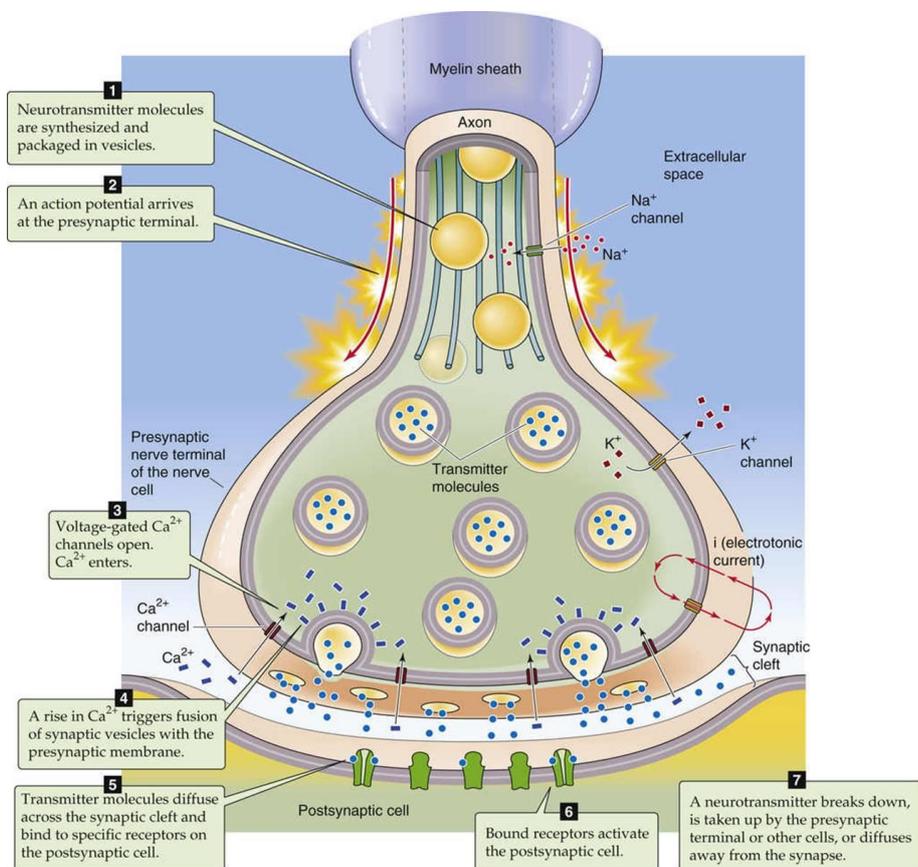


Figura 2. Sinapsis química. Transmisión sináptica representada en 7 pasos, desde la llegada del neurotransmisor en vesículas de la neurona presináptica, a su liberación y unión a las proteínas receptoras en la neurona postsináptica.

Tomado de: Medical Physiology, 2016.

- Abscesos: colección de pus en una cavidad recién formada y que resulta patológica. Por ejemplo, entre el cráneo y la duramadre (epidurales intracraneales) o dentro del cerebro (cerebrales).
2. El propio organismo envuelto por una pared de protección, denominado quiste. Suele ser característico de hongos (*Aspergillus*), protozoos (*Toxoplasma gondii*) y parásitos (*Taenia solium*).

- **Patología inflamatoria**

Como se ha comentado anteriormente, el proceso inflamatorio a nivel del SN puede ser derivado de episodios infecciosos, pero también de reacciones autoinmunitarias, el uso de determinados fármacos y vacunas, trastornos sistémicos etc. En este apartado se exponen los distintos tipos de inflamación a nivel del SNC y SNP, junto con su clínica y causas asociadas.

- **Inflamación a nivel del SNC**

1. **Encéfalo (encefalitis)**

La encefalitis puede presentarse con un cuadro de fiebre, cefaleas, cambios en la personalidad, alucinaciones, agitación, confusión, trastornos conductuales, crisis epilépticas/convulsiones, parálisis o somnolencia. Puede progresar hasta alteraciones del nivel de conciencia, coma y muerte. Aunque es menos frecuente que en casos de meningitis, se pueden dar en ocasiones vómitos y rigidez en la nuca. Entre las causas que pueden desencadenar una encefalitis se encuentran:

- Infecciones:

En primer lugar, los virus, que son la causa más común de encefalitis. Pueden ser causadas por una infección directa del encéfalo o de la médula espinal, dividiéndose en infecciones esporádicas y epidémicas. Ejemplos de encefalitis esporádicas serían el virus de la rabia o el virus de la inmunodeficiencia humana (encefalopatía asociada al VIH/complejo demencia-sida). Se habla de encefalitis epidémicas (Tabla 1), cuando se propagan rápidamente en una población determinada, afectando simultáneamente a un gran número de personas durante un periodo de tiempo concreto. Son causadas por enterovirus o arbovirus, éstos últimos transmitidos por artrópodos (mosquitos, pulgas o garrapatas).

También pueden darse casos de encefalitis por reactivación de una infección vírica pasada, vinculado a herpes simple tipo 1, herpes zóster, virus JC (leucoencefalopatía multifocal progresiva), virus del sarampión (panencefalitis esclerosante subaguda).

Recientemente, en relación con la pandemia generada por la SARS-CoV-2, también se han descrito casos de encefalitis.

En segundo lugar, en ocasiones las bacterias pueden provocar encefalitis derivada de una meningitis bacteriana, es lo que se conoce como meningoencefalitis.

Artrópodo transmisor	Mosquito	Garrapata
Encefalitis epidémicas	Encefalitis de La Crosse	Encefalitis transmitida por garrapatas
	Encefalitis equina oriental	Infección por el virus Powassan
	Encefalitis del Nilo occidental	Fiebre por garrapatas de Colorado
	Encefalitis de San Luis	
	Encefalitis equina occidental	
	Virus Chikungunya	
	Virus de la encefalitis japonesa	
	Encefalitis equina venezolana	
	Virus Zika	

Tabla 1. Clasificación de los tipos de encefalitis epidémicas, según sean transmitidas por mosquitos o garrapatas.

Adaptado de: Encefalitis [Internet]. Disponible en:

<https://www.msmanuals.com>.

Por último, parásitos como las amebas, *Toxoplasma* (en casos de SIDA) o *Plasmodium* (malaria), también pueden infectar el cerebro y causar encefalitis.

- Reacción autoinmunitaria

Desencadenada por una infección cerebral, una vacuna, un cáncer u otro trastorno, que provoca que el sistema inmunológico ataque a las células del SN.

En las encefalitis autoinmunes asociadas, hay autoanticuerpos dirigidos a antígenos de superficie o sinápticos. Son, por ejemplo, las encefalitis anti-receptor de NMDA, encefalitis por anticuerpos contra el receptor de GABA-A o el síndrome de Ofelia (encefalitis por anticuerpos contra el receptor mGluR5).

Por otro lado, existen también encefalitis autoinmunes paraneoplásicas asociadas a algunos tipos de cáncer²: cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de ovario y aparato genital femenino, cáncer de mama, tumores de testículo, timomas, linfomas y discrasias de células plasmáticas. Se vinculan a autoanticuerpos onconeuronales dirigidos frente a antígenos intracelulares.

2. Médula espinal (mielitis)

La mielitis se presenta en forma de una serie de síntomas evolutivos: de forma súbita aparece un dolor en la espalda y una banda de tirantez alrededor de la zona afectada del cuerpo (como el tórax o el abdomen). También puede haber dolor en la cabeza o en el cuello. Posteriormente los síntomas avanzan hacia hormigueo, entumecimiento y debilidad muscular. También aparece dificultad para orinar.

Los síntomas empeoran durante varios días y se agravan, dando lugar a parálisis, pérdida de sensibilidad, retención urinaria y pérdida del control de la vejiga y del intestino.

Dentro de las causas desencadenantes se encuentran:

- Infecciones. Generadas por bacterias (enfermedad de Lyme, sífilis, tuberculosis...), virus (varicela zoster, CMV, VIH, Epstein-Barr, enterovirus, Zika, virus Nilo Occidental). En rara ocasión aparecen asociadas a algunos parásitos u hongos.
- Diversos trastornos sistémicos: Lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, Síndrome de Sjögren, sarcoidosis...
- Procesos autoinmunes derivados de reacciones post infecciosas, y determinados fármacos o vacunas.

3. Meninges (meningitis)

En las meningitis los síntomas característicos son: nuca rígida y dolorosa que hace imposible o muy difícil bajar la barbilla hasta el pecho, dolor de cabeza (cefaleas), fiebre, respuestas de forma lenta o ausencia de respuesta (letargia), foto sensibilidad, rash cutáneo, etc.

La clasificación etiológica más clásica que se realiza es en infecciosas y no infecciosas:

3.1 Meningitis infecciosas:

A grandes rasgos se distingue la meningitis bacteriana de la "aséptica", denominada así por la negatividad en gram y en cultivos bacterianos habituales.

- Meningitis bacteriana, de evolución aguda o subaguda. Diversas especies vinculadas: *Streptococcus pneumoniae* (más común), *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*.
- Meningitis tuberculosa (*Mycobacterium tuberculosis*), de curso crónico.
- Meningitis vírica asociada sobre todo a enterovirus, pero también a varicela zoster, influenza, paperas, VIH y herpes simple tipo 2.
- Meningitis micótica, de curso crónico y asociado a *Cryptococcus neoformans* o *Histoplasma*, que se halla frecuente en pacientes con SIDA.

3.2 Meningitis no infecciosas

Causadas por reacciones a fármacos (AINEs, antibióticos, contrastes radiológicos) o vacunas. También por diversos trastornos autoinmunitarios (como artritis reumatoide, LES, Síndrome de Sjögren); rotura de quistes cerebrales; algunos tipos de cáncer (leucemia, linfoma, cáncer mama o pulmón);

o enfermedades inflamatorias (Sarcoidosis, Enfermedad de Behçet).

- Inflamación a nivel del SNP

Se denomina neuritis a la inflamación de uno o más nervios, causada por lesiones directas del nervio, infecciones o enfermedades autoinmunes, heridas, deficiencias alimentarias, alcoholismo, etc.

Generalmente la neuritis suele afectar los ojos (neuritis óptica), la zona costal (neuritis intercostal), y la zona del nervio vestibular (neuritis vestibular).

Los síntomas más comunes son dolor, generalmente de carácter urente o punzante, sensación de hormigueo, alteraciones sensoriales, entumecimiento, hipersensibilidad, pérdida de la fuerza muscular, alteración del arco reflejo, y alteraciones de la circulación.

- Patologías inflamatorias

Una vez descrita la inflamación a nivel de estructuras con las causas asociadas, un resumen de las patologías causantes de inflamación a nivel del SN recogería:

1. Infecciones.
2. Reacciones autoinmunes (postinfecciosas, vacunales).
3. Enfermedades autoinmunes (LES, AR, síndrome de Sjögren).
4. Enfermedades desmielinizantes³. Son un grupo de enfermedades con afectación inflamatoria de la mielina, sustancia blanca que recubre los axones neuronales. Esta capa protectora es destruida, por lo que los impulsos nerviosos se ralentizan o incluso detienen.
 - Esclerosis múltiple (EM): es la más común, el sistema inmunitario ataca la vaina de mielina o a las células que la producen y mantienen. Esto genera inflamación y lesiones en la vaina de las fibras nerviosas a nivel del SNC (cerebro y médula espinal) y SNP (nervio óptico). Al perderse la vaina quedan múltiples zonas de cicatrización (esclerosis). Los síntomas son muy variados y cambian de una persona a otra según la afectación, por ello se le denomina la "enfermedad de las mil caras". Van cursando con brotes según se vaya incrementando el daño neuronal. Entre los síntomas se encuentran: fatiga, alteración de la marcha, debilidad o entumecimiento de extremidades, torpeza, sensibilidad anormal o reducida, y alteraciones visuales
 - Encefalomiелitis aguda diseminada (ADEM): postinfecciosa, debido a que las proteínas del virus se asemejan a la mielina, provoca inflamación de cerebro y médula espinal.
 - Neuritis óptica: inflamación del nervio óptico en uno o ambos ojos.
 - Mielitis transversal.
 - Neuromielitis óptica (enfermedad de Devic).
 - Leucodistrofias: (Adrenoleucodistrofia, adrenomieloneuropatía). Son un grupo de trastornos

metabólicos genéticos relacionados con el metabolismo de la mielina.

- Polineuropatías desmielinizantes inflamatorias, a nivel del SNP, que puede ser aguda (síndrome de Guillain-Barré) o de curso crónico.
- 5. Enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer, Parkinson, Esclerosis lateral amiotrófica, Corea de Huntington, etc.
- 6. Enfermedades cardiovasculares como el ictus.
- 7. Traumatismos.
- 8. Tumores.

MÉTODOS BIOQUÍMICOS DE DIAGNÓSTICO. LCR

Para el estudio bioquímico de las alteraciones neurológicas, la muestra a analizar es el líquido cefalorraquídeo (LCR), ya que aporta información de procesos patológicos relacionados con el encéfalo, la médula y las meninges. En el adulto ocupa un volumen aproximado de 150 ml distribuidos por el espacio subaracnoideo (120 ml, entre la membrana aracnoidea y piamadre), y los ventrículos del cerebro y cisternas que lo rodean (30ml).

Las principales funciones del LCR son de soporte y protección del SNC, control de las características químicas del entorno, transporte de hormonas y neurotransmisores y vehículo para la excreción de productos relacionados con el metabolismo celular.

Se sintetiza en su mayor parte (70%) en los plexos coroideos por un mecanismo combinado de ultrafiltración del plasma y transporte activo. Otra parte (30%) se sintetiza en el revestimiento endimario de los ventrículos y el espacio subaracnoideo. Una vez sintetizado pasa al tercer y cuarto

ventrículo y llega hasta el espacio subaracnoideo, donde circula entre los hemisferios cerebrales y una pequeña parte hacia la médula espinal (Figura 3).

Se reabsorbe en las vellosidades aracnoideas, que son proyecciones que se introducen en las paredes de los senos venosos. Agrupaciones de estas vellosidades constituyen unas estructuras macroscópicas denominadas granulaciones aracnoideas. Cualquier desequilibrio entre su producción y reabsorción o circulación produce diversas patologías, reflejándose en su composición.

El riesgo y la dificultad de la toma de la muestra hace que sea una muestra muy preciada. Se obtiene por punción lumbar, introduciendo una aguja biselada en el espacio intervertebral (L4-L5) hasta llegar al espacio subaracnoideo (Figura 3). Se deben extraer tres tubos estériles, el primero para análisis bioquímico/inmunológico, el segundo para microbiología y el tercero para citología. Requiere de un procesamiento inmediato.

• Determinaciones urgentes

- Glucosa

Atraviesa la BHE por mecanismos de difusión pasiva y transporte activo, por lo que su concentración en LCR depende de su concentración sanguínea.

Los incrementos no tienen significación diagnóstica en sí misma, pero puede enmascarar una disminución. Se relacionan con una glucemia elevada 2-4 horas antes de la obtención de la muestra, con algunos casos de encefalitis o con una presión intracraneal elevada (traumatismo cerebral, tumores o lesiones hipotalámicas).

Las disminuciones se deben a hipoglucemias sanguíneas, pero también se asocian a casos de meningitis bacterianas

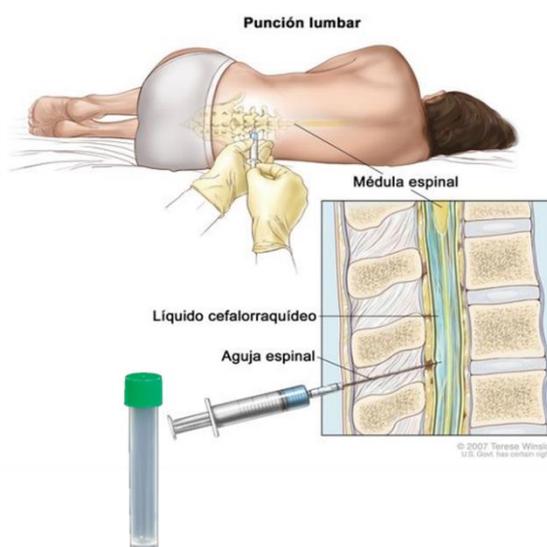
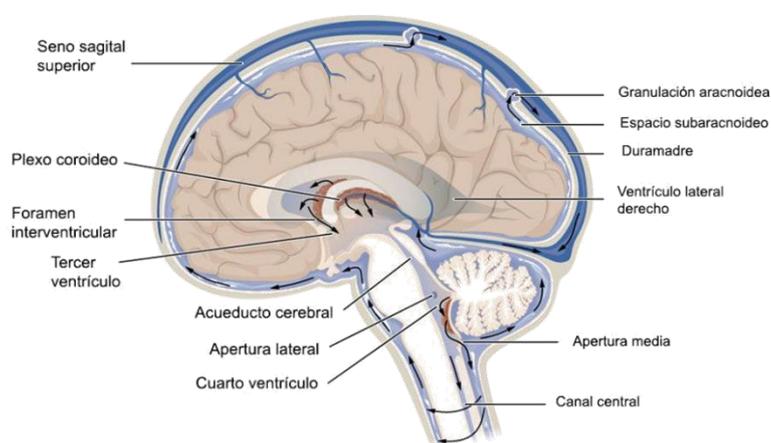


Figura 3. Líquido cefalorraquídeo (LCR). Izquierda, distribución del LCR por el espacio subaracnoideo desde su síntesis en los plexos coroideos hasta su reabsorción en las vellosidades aracnoideas. Derecha: punción lumbar entre las vértebras L4 y L5 para la obtención del LCR, que se recoge en tubos estériles sin anticoagulante. Adaptado de: El líquido cefalorraquídeo (LCR), características y función [Internet]. Disponible en: <https://www.psicoactiva.com/>; Punción lumbar (punción espinal) [Internet]. Disponible en: <https://medlineplus.gov>.

(en un 50% de ellas), tuberculosas y fúngicas. Otras causas son: toxoplasmosis, sarcoidosis, hemorragias subaracnoideas, tumores primarios y secundarios del cerebro y plexos coroideos, linfomas, leucemias, carcinomatosis meníngea y melanomatosis.

El descenso en los niveles se produce por un aumento del consumo celular (polimorfonucleares, células neoplásicas o bacterias) o por inhibición de la entrada de glucosa debido a cambios en la BHE.

Sirve como monitorización de respuesta al tratamiento ya que sus valores retornan pronto al intervalo fisiológico.

- **Proteínas**

El 80% difunden desde el plasma al LCR atravesando la BHE, dependiendo de sus características físico-químicas (carga eléctrica, masa molar y radio). Otros factores condicionantes son la concentración plasmática y el estado de la BHE. El 20% restante se origina por síntesis intratecal.

Su medición sirve para valorar el estado de la BHE y para descubrir procesos inflamatorios o de degeneración/destrucción del SNC, dando lugar a liberación de proteínas específicas.

Los aumentos se vinculan a:

1. Meningitis. Importante para el diagnóstico diferencial entre bacteriana y aséptica. Hay que tener en cuenta que:
 - Al inicio no suele elevarse la concentración de proteínas.
 - En las agudas bacterianas la concentración se eleva por encima de 1.5g/L.
 - En un 10% de las meningitis bacterianas no hay elevación de proteínas.
 - Un 1% de las meningitis víricas cursan con elevación de proteínas superior a 1.7% frente al 50% de las bacterianas.
2. Síntesis proteica por parte del tumor.
3. Obstrucción al flujo del LCR en caso de traumatismos o tumores.
4. Accidentes vasculares (embolia cerebral, hemorragia).
5. Punción traumática, por contaminación.
6. Degeneración del tejido cerebral (síndrome de Guillain Barré, Parkinson, ELA).
7. Esclerosis múltiple, donde hay mayor síntesis proteica en el SNC por infiltrados linfoplasmocíticos que aumentan la síntesis de inmunoglobulinas.

No es frecuente su disminución, pero puede ser debido a hipertensión intracraneal, donde hay mayor filtración por las vellosidades; pérdida de LCR (traumatismos, desgarros duros o punciones previas) o a hipertiroidismo.

- **Lactato**

No atraviesa la BHE, por lo que su concentración no tiene relación con la del suero. Es producto del metabolismo anaerobio del SNC, por tanto, aumenta en casos donde se vea reducido el flujo sanguíneo o la oxigenación del cerebro.

Es muy útil como marcador para el diagnóstico precoz de meningitis bacterianas y fúngicas, detectándose en ocasiones antes que la pleocitosis. Se mantiene alterada durante más tiempo después del tratamiento, por lo que resulta poco útil para el seguimiento.

Otras situaciones que provocan la elevación de lactato en LCR son la hipoxia o la presencia de tumores.

• **Otras determinaciones**

- **Síntesis intratecal de inmunoglobulinas G**

En condiciones fisiológicas, las inmunoglobulinas (Igs) presentes en LCR provienen principalmente de la difusión pasiva desde el plasma, siendo la síntesis local muy baja (3mg/día). El aumento de IgG puede reflejar una alteración inmunológica y un proceso inflamatorio del SNC, en el caso de que haya producción de Igs por parte de clones activados de linfocitos B con heterogeneidad restringida.

Cuando hay un aumento de la concentración de IgG es necesario saber si es fruto de un aumento policlonal o monoclonal en suero, de la alteración de la BHE o por una producción intratecal.

1. Estudio cualitativo: Bandas oligoclonales (BOC)

El método de detección más sensible y recomendado en la actualidad es el isoelectroenfoque en gel de agarosa y posterior inmunodetección con anticuerpos IgG marcados con peroxidasa o fosfatasa alcalina. Es esencial procesar una muestra de LCR en paralelo con una de suero del paciente.

Teóricamente se pueden identificar cinco patrones o perfiles (Figura 4), siendo los patrones 2 y 3 los que representan síntesis intratecal de Igs:

- Patrón 1. Normal, ausencia de BOC.
- Patrón 2. Oligoclonal solo en LCR: respuesta inmune a nivel del SNC. Por ejemplo, en casos de EM.
- Patrón 3. Oligoclonal, tanto en LCR como en suero, pero siendo mayor en LCR. Se debe a un proceso sistémico con respuesta inmune añadida a nivel del SNC.
- Patrón 4. Perfil en espejo, oligoclonal idéntico en LCR y suero. Relacionado con un proceso sistémico.
- Patrón 5. Perfil en espejo, monoclonal similar en suero y LCR. Por ejemplo, asociado a una gammapatía monoclonal.

Este estudio tiene interés diagnóstico en sospecha de EM, ya que la presencia de BOC en LCR ha sido observada en gran cantidad de pacientes, donde el patrón oligoclonal es característico de cada paciente y permanece inalterado en el tiempo. Presenta alta sensibilidad, pero sin embargo no son específicas de EM, hay otras enfermedades inflamatorias e infecciosas con síntesis intratecal que cursan con aparición de este tipo de bandas en LCR.

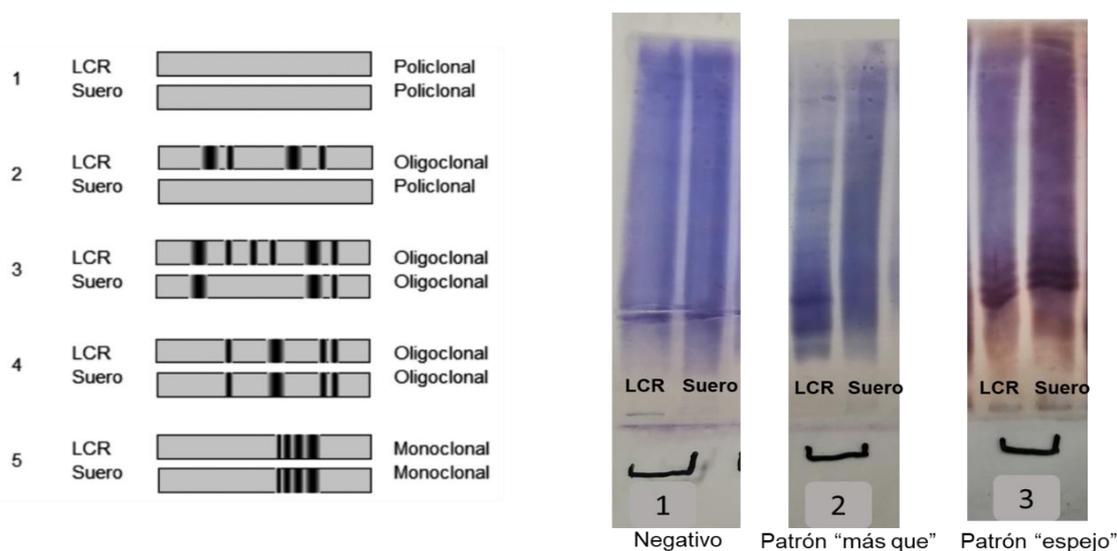


Figura 4. Diferentes patrones en la determinación de las bandas oligoclonales en líquido cefalorraquídeo (LCR) frente al suero. **Izquierda:** esquematización de las cinco posibilidades teóricas. Valldecabres Ortiz, C., 2015. **Derecha:** imágenes de geles de agarosa que muestran los tres tipos de patrones que se informan en el servicio de inmunología del H.U. 12 de Octubre: 1. Negativo; 2. Patrón "más que", donde se observan más bandas oligoclonales IgG en LCR que en suero y es sugerente de síntesis intratecal de IgG; 3. Patrón "espejo", donde se observan el mismo número de bandas oligoclonales IgG en LCR y en suero y no sugiere de síntesis intratecal de IgG. Elaboración propia.

2. Estudio cuantitativo con el que medir indirectamente la síntesis intratecal

- Concentración de albúmina e IgG e índices.

Aunque existen diversas fórmulas que permiten conocer indirectamente si hay o no producción intratecal, únicamente se van a definir dos de ellas.

En primer lugar, el Índice albúmina LCR/suero, que se utiliza para conocer la integridad de la BHE. Aunque la albúmina es la proteína más abundante en LCR, cuando el valor del índice es superior a 9, indica una alteración de la BHE.

$$\text{Cociente de Albúmina} = \frac{\text{Alb}_{\text{LCR}}(\text{mg/L})}{\text{Alb}_{\text{S}}(\text{g/L})}$$

En segundo lugar, el Índice IgG LCR/Suero o índice de Tibbling-Link, utilizado para determinar síntesis intratecal. El valor de referencia es 0.3-0.7. Valores superiores a 0.7 indican síntesis intratecal de Ig, observándose en 90% de pacientes con EM.

$$\text{Índice de IgG} = \frac{\text{IgG}_{\text{LCR}} \cdot \text{Alb}_{\text{S}}}{\text{IgG}_{\text{S}} \cdot \text{Alb}_{\text{LCR}}}$$

- Kappa libre. Recientemente se ha descrito como otro método indirecto para la detección de Ig intratecales, cuantificando tanto el valor de cadenas kappa libres, como el índice LCR/Suero.
- Proteína básica de la mielina: actúa como antígeno en esclerosis múltiple y su determinación ayuda en la monitorización tras el tratamiento.

FÍSTULAS DE LCR

Las fístulas de LCR son extravasaciones del LCR desde el espacio subaracnoideo a las cavidades ubicadas en la base del cráneo: cavidad nasal, senos paranasales, caja timpánica

y senos mastoideos. Se producen tras la rotura de las barreras que separan estas cavidades del espacio subaracnoideo, es decir, la base craneal, duramadre y aracnoides.

Según su etiología pueden ser: primarias o espontáneas (3-4%), relacionadas con malformaciones de la base craneal; o bien secundarias, en las que el 80% son derivadas de traumatismos craneofaciales. El resto son iatrogénicas como resultado de intervenciones quirúrgicas.

El síntoma clínico sugestivo es la aparición de rinorrea unilateral, en su mayoría, u otorreas, acompañado de cefaleas y sinusitis.

La principal importancia de una fístula de LCR es que constituye una puerta de entrada hacia el SNC de microorganismos, pudiendo ocasionar encefalitis o meningitis.

El diagnóstico clínico se confirma con una serie de pruebas, como la endoscopia endonasal, distintas técnicas de imagen, administración de fluoresceína intratecal (para localización y verificación de su cierre) o bien marcadores bioquímicos específicos. Éstos se tienen que encontrar exclusivamente en LCR o su concentración debe ser lo bastante superior a la de otros líquidos biológicos, como la sangre.

1. Transferrina desializada o β 2-transferrina (banda tau).
2. Proteína β -traza.
3. Glucosa y proteínas totales.
4. Prealbúmina: llega desde el plasma, pero también se sintetiza en los plexos coroideos, por lo que su concentración relativa (en relación a proteínas totales) es mayor en LCR que en otros líquidos biológicos. Se utilizaba para confirmar las pérdidas de LCR, pero actualmente está siendo desplazada por la β 2 transferrina o la proteína beta traza.

1. Transferrina desializada o $\beta 2$ transferrina o banda tau.

Se denomina así porque en electroforesis en gel de agarosa aparece una banda adicional, que migra más retrasada ($\beta 2$) que la transferrina nativa o tetrasializada ($\beta 1$).

Se trata de la forma desializada de la transferrina (proteína transportadora del ión férrico), procesada por las neuraminidasas cerebrales que digieren los residuos de ácido siálico. Se encuentra principalmente en LCR, aunque también en perilinfa y humores acuoso y vítreo. Sin embargo, no se detecta habitualmente en suero ni otras secreciones, aunque es cierto que en pacientes con consumo crónico y elevado de alcohol y ciertas variantes genéticas de baja frecuencia sí que puede aparecer en suero.

El método de detección es cualitativo, mediante electroforesis en gel de agarosa para la separación de las formas sializada y desializada, y posteriormente inmunofijación con anticuerpos anti-transferrina marcados con peroxidasa. Aparece como una banda más catódica que la transferrina nativa.

La detección de esta proteína presenta como ventajas:

- Una sensibilidad diagnóstica del 73-93% y una especificidad del 97-100%.
- Requiere un volumen muy pequeño de muestra (10 μ L).
- Permite la utilización de muestras más viscosas y de muestras con una contaminación sanguínea moderada.

Entre las desventajas están el requerir de un método electroforético laborioso para su detección, con un tiempo de realización elevado (120-150 minutos). Además, el punto de aplicación de la muestra está muy cercano a la zona de migración de la $\beta 2$ transferrina y dificulta la interpretación del resultado.

2. Proteína beta traza

Enzima con actividad prostaglandina-D2 sintasa. Es sintetizada por los plexos coroideos y leptomeninges, por lo que se encuentra principalmente en LCR, siendo una de las proteínas más abundantes tras la albúmina. Se pueden encontrar en pequeñas concentraciones en el humor acuoso y perilinfa.

Se detecta cuantitativamente mediante un método inmunonefelométrico. Para su utilización diagnóstica se requiere establecer un punto de corte a partir del cual se considera positivo la presencia de LCR en la muestra. Inicialmente los que estaban descritos en la literatura tenían un amplio rango (0,35 a 6,00 mg/L). Por ello, un estudio⁴ propone un punto de corte en 0,68mg/L (con el que obtienen un valor predictivo negativo para descartar fístula en LCR del 100%) y superior a 1.14mg/L para confirmar fístula.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que hay situaciones clínicas donde se altera su valor, como son la insuficiencia renal (que provoca su elevación) y la meningitis bacteriana (que lo disminuye).

Cuando los valores se encuentran entre 0.68 y 1.14 mg/dL no es posible dar una respuesta concluyente, por lo que la determinación de $\beta 2$ transferrina podría ayudar a esclarecer si se trata de una fístula, al igual que en situaciones donde no es posible determinarla por viscosidad o escasez de la muestra, insuficiencia renal o meningitis bacteriana. Con esto, Cárdenas MC *et al.* establecen un algoritmo de trabajo en caso de sospecha de fístula (Figura 5). Dada la urgencia e importancia diagnóstica de la determinación de la presencia de LCR, la muestra se procesa el día de su recepción para la medida de la proteína β -traza. Se solicita una nueva muestra cuando haya mucha sospecha y ambos, $\beta 2$ transferrina y β -traza sean negativos, ya que puede ser un falso negativo por pérdida intermitente o escasa de LCR.

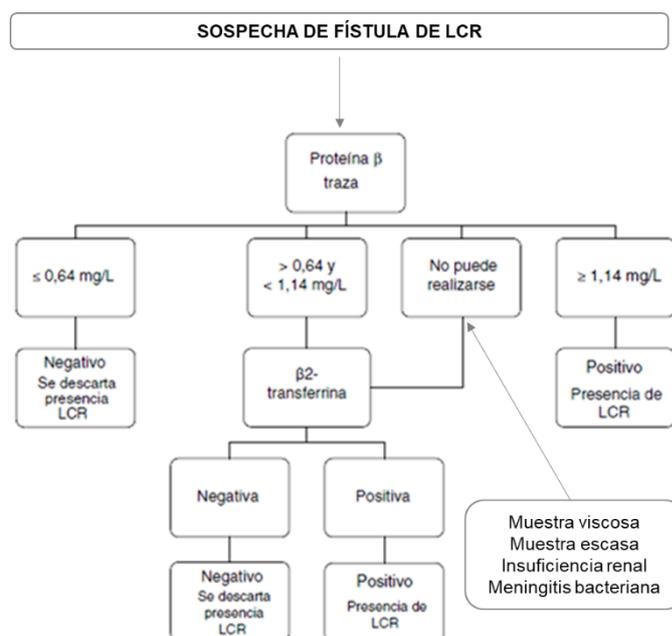


Figura 5. Algoritmo de trabajo para la confirmación de fístulas de líquido cefalorraquídeo, incluyendo la determinación de dos parámetros bioquímicos, la proteína β -traza y la $\beta 2$ transferrina. Adaptado de: Cárdenas *et al.*, 2017.

3. Glucosa y proteínas totales

Un estudio prospectivo⁵ plantea el poder aplicar la concentración de glucosa y proteínas totales para el diagnóstico de fístula. Debido a que la determinación de $\beta 2$ -transferrina y la proteína β -traza no está disponible en todos los laboratorios, tanto por motivos económicos como por una demanda poco significativa, por desconocimiento o por algoritmos de actuación que no las contemplan.

Está ampliamente documentado que el LCR presenta concentraciones más elevadas de glucosa que la secreción nasal, además de una menor concentración de proteínas, incluso en situaciones donde la proteinorraquia se incrementa, como infecciones o traumatismos.

De este modo se realizó un estudio analizando glucosa y proteínas totales en LCR y secreciones nasales. Revisando los resultados, establecieron un punto de corte para considerar que la muestra pertenecía a LCR: cifras de glucosa superior a 40 mg/dL y de proteínas totales inferiores a 100 mg/dL.

Posteriormente, se compararon diagnósticos de casos sospechosos de fístula tanto con este método biparamétrico como con el método con la β 2-transferrina, y se comprobó con el diagnóstico definitivo obtenido mediante técnicas de imagen. Los resultados de ambos métodos fueron bastante similares y certeros, con una sensibilidad, especificidad y precisión del 88%, 89,9% y 89,2% respectivamente para el método biparamétrico frente al 89,2%, 94,6% y 92,8% de la β 2-transferrina. Además, el valor predictivo negativo obtenido con ambos métodos era del 94%, por lo que el método biparamétrico permite descartar con alta probabilidad la presencia de fístula.

- Valldecabres C, Gella A, Castillo C, Pérez C, Martínez C, Llompart I. Recomendaciones para el estudio de las proteínas del líquido cefalorraquídeo. Documentos de la SEQC. 2014; 57-67.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. Escobar A, Gómez González B. Barrera hematoencefálica. Neurobiología implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. Rev Mex Neurocienc. 2008;9(5):395-405.
2. Erro-Aguirrea ME, Maisterra-Santosa O, Gallego-Culieréa J. Síndromes paraneoplásicos neurológicos. Med Clin (Barc). 2005;125(14):543-7.
3. Torrades Oliva, S. Esclerosis múltiple y otras enfermedades desmielinizantes. Offarm. 2004;23(11):86-90.
4. Cárdenas Fernández MC, Gimeno Hernández J, Lombardía González C, Fernández-Miranda CM. Utilidad de la β 2-transferrina y la proteína β -traza en el diagnóstico de fístula de líquido cefalorraquídeo. Rev Lab Clin. 2017;10(4):173-9.
5. García-Callejo FJ, Balaguer-García R, García-Aguayo JM, Alba-García JR, Juantegui-Azpilicueta M. Medición de glucosa y proteínas totales en riorreas como herramienta diagnóstica de fístulas de líquido cefalorraquídeo. An Orl Mex. 2020;65(2):71-9.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Boron W, Boulpaep E. Medical Physiology. 3^o ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2017.
- Crossman AR, Neary D. Neuroanatomía. Texto y atlas en color. 5^o ed. Madrid: Elsevier Masson; 2015.
- Guillén Campuzano E, Buño Soto A, Díaz García R, Galán Ortega A, Guevara Ramírez P, Malumbres S, et al. Recomendaciones para el estudio del líquido cefalorraquídeo. Documentos de la SEQC. 2010; 12-16.
- Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiología Médica. 12^a ed. Madrid: Elsevier; 2011.
- Pró EA. Anatomía Clínica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2012.
- Trastornos neurológicos [Internet]. Manual MSD [Accedido Febrero 2021]. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es-es/professional/trastornos-neurológicos>

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: FISIOPATOGENIA Y BIOMARCADORES

Autores: Ylenia Pérez Arnaiz; Alba Fernández del Pozo

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

Palabras clave: Alzheimer, β -amiloide, *Tau* hiperfosforilada

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo, crónico, progresivo e irreversible que constituye la principal causa de demencia relacionada con la edad, siendo esta el principal factor de riesgo de esta patología.

En rasgos generales, la fisiopatología de la enfermedad está relacionada con el acúmulo de proteínas, como β -amiloide y *Tau* hiperfosforilada (*pTau*) en el cerebro, provocando un deterioro progresivo que afecta inicialmente a la memoria (con especial predilección por la memoria a corto plazo) y posteriormente al habla y al sentido de la orientación, habilidades cognitivas, conductuales y psicológicas.

La EA fue descrita por primera vez en 1906 por el psiquiatra y neuropatólogo alemán Alois Alzheimer en una conferencia titulada "Una enfermedad grave característica de la corteza cerebral". En ella recogía el estudio realizado a Auguste Deter, una mujer de 51 años de edad que padecía demencia progresiva y alucinaciones. Tras el fallecimiento de esta, A. Alzheimer realizó un análisis post mortem del cerebro encontrando dos tipos de anomalías: depósitos extracelulares (interneuronales) de proteínas, denominados placas seniles y una maraña de proteínas dentro de las neuronas, designados entonces ovillos neurofibrilares.

Sin embargo, no fue hasta 1976 cuando la EA fue reconocida como una forma frecuente de demencia y hasta los años 80 cuando se conoció que las placas seniles estaban compuestas de un péptido denominado β -amiloide.

EPIDEMIOLOGÍA

La EA constituye, junto con la enfermedad de Parkinson, la patología neurodegenerativa más prevalente entre la población del mundo desarrollado. Actualmente, en torno a 800.000 personas padecen la enfermedad sólo en España, ascendiendo esta cifra a 50 millones de afectados a nivel mundial.

La EA supone un gran impacto en la sociedad y en nuestro sistema sanitario debido a que la prevalencia de la enfermedad a nivel europeo se sitúa entre el 3-7% de la población mayor de 60 años aumentando hasta un 34% en mayores de 85 años. Además, debido a la tendencia de nuestro entorno y al envejecimiento poblacional como consecuencia del aumento de la esperanza de vida, se prevé que la prevalencia aumente progresivamente por lo que la EA constituirá uno de los problemas sociosanitarios de mayor envergadura a resolver en los próximos años.

En España, cada año se diagnostican unos 150.000 nuevos casos de EA, y aun así se considera una enfermedad infradiagnosticada ya que se estima que el 80% de los casos que aún son leves no están identificados. Esta situación impide la administración, de forma precoz, de tratamientos que ralenticen el deterioro cognitivo.

Por todo ello, es necesario el estudio de biomarcadores de la EA que permitan detectar esta patología en estadios iniciales, así como evaluar nuevas terapias encaminadas a detener o retrasar su evolución.

FACTORES DE RIESGO DE LA EA

La EA es el resultado del efecto de un conjunto de factores de riesgo modificables (tabaquismo, sedentarismo, mala alimentación, distintos tratamientos farmacológicos, aislamiento social...) y no modificables (edad, presencia del alelo E4 de la apolipoproteína E, diabetes, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares, etc.). Además, se conoce la existencia de ciertos factores protectores como poseer un mayor nivel educacional, cultura, participación en actividades intelectuales, que permiten que ciertos individuos presenten la enfermedad más tarde que aquellos sujetos con las mismas alteraciones histopatológicas. Esto es debido a que la educación y la exposición a actividades mentales y sociales aumenta las conexiones interneuronales compensando el daño cerebral y retrasando la aparición de la demencia.

Entre los factores de riesgo cabe destacar la presencia del alelo ApoE4 del gen *APOE*, muy relacionado con el riesgo de padecer EA. La ApoE es una proteína con alta expresión cerebral implicada en múltiples procesos celulares como el transporte de colesterol y, a nivel del sistema nervioso central (SNC), es importante en la plasticidad sináptica. Presenta tres isoformas distintas: ApoE2, ApoE3 y ApoE4. La presencia del alelo ApoE2 se describe como un factor de protección para la EA al tener una mayor eficacia reparadora y neuroprotectora. Sin embargo, la presencia del alelo ApoE4 se ha asociado a un incremento del riesgo de padecer EA, sobre todo si este alelo se encuentra en homocigosis. El aumento del riesgo se debe a que en la apolipoproteína E4 se da una interacción entre los dominios N y C terminal que disminuye la estabilidad proteica. Ello hace que sea nociva para la microcirculación cerebral, facilitando además la agregación de los péptidos de β -amiloide y disminuyendo su eliminación a través de la barrera hematoencefálica.

Por último, se ha demostrado que estas tres isoformas son capaces de promover, diferencialmente, la transcripción del gen *APP*, que codifica la proteína precursora de amiloide

(APP), siendo la ApoE4 la que induce de forma más intensa su expresión, favoreciendo la elevación de los niveles cerebrales de β -amiloide. Esto explicaría la mayor expresión de esta isoforma en distintas demencias como EA, demencia vascular y demencia con cuerpos de Lewy.

ETIOPATOGENIA

El cerebro de los pacientes con EA sufre distintas alteraciones tanto macroscópicas como microscópicas (Tabla 1).

Alteraciones macroscópicas	Contracción del giro cerebral
	Ensanchamiento de los surcos
	Engrosamiento de las leptomeninges
	Dilatación de los ventrículos
Alteraciones microscópicas	Formación de ovillos neurofibrilares (intra neuronales)
	Formación de placas de amiloide o placas seniles (interneuronales)

Tabla 1. Alteraciones fisiopatológicas en la EA. Elaboración propia.

En primer lugar, es importante tener en cuenta que estas alteraciones microscópicas no son exclusivas de la EA, sino que aparecen en otros tipos de enfermedades neurodegenerativas como en la demencia por cuerpos de Lewy o en la parálisis supra nuclear progresiva, incluso es común encontrarlas como consecuencia del envejecimiento habitual, pero en este caso el número de lesiones es menor y se distribuyen de manera difusa por el cerebro.

El acúmulo de diversas proteínas como β -amiloide y pTau, provoca una desestructuración neuronal que derivará en muerte neuronal y pérdida de sinapsis dando lugar a la sintomatología característica de la enfermedad: la demencia.

• Placas seniles o placas de amiloide

Las placas de amiloide están formadas por el acúmulo extracelular de proteína β -amiloide. Esta proteína se forma por escisión proteolítica de la APP, una glucoproteína transmembrana codificada por el gen *APP* localizado en el cromosoma 21. Existen tres grupos de enzimas secretasas que catalizan la escisión de la APP: α -secretasas, β -secretasas (BACE-1) y γ -secretasas (presenilina 1, PSEN1, y presenilina 2, PSEN 2). En función de las enzimas que participen se obtendrá un producto proteico diferente y se hablará de un tipo u otro de escisión proteolítica:

- **Proteólisis no amiloidogénica (fisiológica):** llevada a cabo por la α -secretasa y γ -secretasa dando lugar a los péptidos α -APP y p3.
- **Proteólisis amiloidogénica (patológica):** en este caso, la metabolización de APP se lleva a cabo por la β -

secretasa y γ -secretasa. El corte de la β -secretasa tiene lugar en el dominio extracelular N-terminal de la proteína mientras que el corte por la γ -secretasa se da en el dominio transmembrana C-terminal. El resultado final de esta escisión son los péptidos β -APP y β -amiloide. El 90% del β -amiloide formado es una proteína de 40 aminoácidos conocida como $A\beta$ -40 mientras que el 10% restante es una proteína de 42 aminoácidos, $A\beta$ -42, más insoluble que la anterior y que tiende a oligomerizar dando lugar a fibras y placas seniles que, en ocasiones, pueden aparecer en el seno de agrupaciones de neuronas distróficas, denominándose entonces placas neuríticas y asociándose a un mayor daño neuronal.

Las formas familiares de la EA por mutaciones en el gen *APP* se relacionan con modificaciones en la zona de la proteína donde actúan la β -secretasa y γ -secretasa, dando lugar a un incremento de la relación $A\beta$ -42/ $A\beta$ -40. Del mismo modo, se observa una ratio $A\beta$ -42/ $A\beta$ -40 aumentada en el caso de las mutaciones en los genes que codifican para las presenilinas 1 y 2 (γ -secretasas), *PSEN 1* y *PSEN 2*, ya que se produce un aumento de la actividad γ -secretasa.

• Ovillos neurofibrilares

La proteína *Tau* asociada a los microtúbulos, codificada por el gen *MAPT* localizado en el cromosoma 17, se encarga de regular la polimerización de los monómeros de los microtúbulos del citoesqueleto, facilitando la formación y estabilización de los neurofilamentos que sostienen el axón neuronal.

En primer lugar, cabe recordar la importancia del citoesqueleto para mantener la estructura celular y permitir la extensión de neuritas y conexiones neuronales (plasticidad neuronal), en el tráfico intracelular de proteínas y orgánulos, incluido el transporte a lo largo de los axones. Por lo tanto, sus alteraciones pueden modificar fácilmente el transporte axonal y afectar a las funciones de las terminaciones sinápticas y, en consecuencia, a la viabilidad neuronal.

Los microtúbulos del citoesqueleto están formados por α -tubulina y β -tubulina, así como por otras proteínas asociadas como la proteína *Tau*. Esta proteína presenta seis isoformas distintas formadas por *splicing* alternativo de un único ARN mensajero. Todas ellas se encuentran en el SNC del adulto con alta expresión en axones corticales.

Esta proteína puede fosforilarse en el dominio de unión a microtúbulos disminuyendo su afinidad por estos y, en consecuencia, la polimerización. En la EA, la proteína *Tau* se hiperfosforila (existen hasta 39 zonas distintas de fosforilación), desensamblándose el citoesqueleto y alterándose el flujo axoplásmico, perdiendo la conectividad neuronal. Además, la proteína pTau es capaz de llegar a neuronas intactas a través del espacio sináptico y provocar la hiperfosforilación de otras proteínas *Tau*. Estos monómeros de pTau presentan resistencia a la acción de proteasas derivando en una degradación ineficiente, acumulándose y favoreciendo su asociación entre sí formando agregados filamentosos insolubles que se

organizan en forma de filamentos helicoidales que darán lugar a los ovillos neurofibrilares intracitoplasmáticos.

Estos acúmulos de *Tau* no son específicos de la EA, también se dan en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Pick (demencia frontotemporal). Las enfermedades donde se producen acúmulos de proteína *Tau* se conocen como taupatías.

ETAPAS Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La sintomatología clínica de la EA se puede dividir en un total de seis etapas en función de la deposición y cantidad de ovillos neurofibrilares formados en las distintas regiones del cerebro.

Las etapas iniciales de la enfermedad (I y II) cursan con un deterioro de la memoria a corto plazo y una desorientación espacial moderada. Estos primeros síntomas suelen ser el motivo de consulta de pacientes y familiares y se deben a un depósito de ovillos en tronco cerebral y cortezas entorrinales y transentorrinales, en el lóbulo temporal medio.

Las etapas intermedias (III y IV) cursan, además, con desorientación en tiempo y espacio, dificultades de comprensión y conceptualización en el habla y otros síntomas de demencia (debido al depósito en hipocampo y corteza límbica, también en lóbulo temporal).

En las etapas finales (V y VI) se produce una acumulación en áreas motoras (neocórtex) y zonas sensitivas agravando los síntomas anteriores y añadiendo dificultad para el reconocimiento de objetos y otras habilidades perceptuales y motoras.

Las distintas guías clínicas de la EA numeran hasta 10 signos de alarma de la EA por los cuales se debe acudir a un especialista:

- Pérdida de memoria que afecta a la vida diaria
- Dificultad para llevar a cabo tareas del hogar
- Problemas con el lenguaje
- Desorientación espacio-temporal
- Juicio pobre o disminuido
- Problemas con el pensamiento abstracto, como los números
- Pérdida de objetos
- Cambios en el humor o en el comportamiento
- Cambios en la personalidad
- Pérdida de iniciativa

Otras complicaciones más avanzadas son: síntomas psicóticos, agitación, agresividad, trastornos del sueño, crisis epilépticas y trastornos del apetito. En fases finales se afectan el sistema motor y la deglución, condicionando trastornos de la marcha, encamamiento, úlceras, trombosis venosa, malnutrición e infecciones, que si se agravan pueden llegar a ocasionar el fallecimiento del paciente.

FORMAS Y SUBTIPOS

Existen dos tipos bien diferenciados de EA: la EA de inicio precoz, forma hereditaria de la EA producida por mutaciones en varios genes; y la EA de inicio tardío, senil o esporádico, sin causa bien definida actualmente.

• EA hereditario

Las formas de EA hereditarias son minoritarias, representando entre un 1-5% de todos los casos. Se caracteriza por su inicio precoz y aparece en pacientes menores de 60 años en su mayoría con historia familiar positiva.

Hoy en día se conocen mutaciones patogénicas en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*, presentando un patrón de herencia autosómica dominante.

• EA de inicio tardío, senil o esporádico

Esta forma de EA representa entre el 95-98% de los casos. Cursa sin historia familiar positiva y la genética actúa únicamente como factor de riesgo.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico precoz de EA es clave para prevenir que un deterioro cognitivo leve progrese a EA y para llevar a cabo una terapia exitosa que ralentice la aparición de la enfermedad.

El diagnóstico definitivo de la enfermedad es neuropatológico *post mortem* y solo se realiza en vida de manera excepcional. Por ello, en la mayoría de los casos, el diagnóstico es de probabilidad, excepto en aquellos pacientes en los que se conoce la existencia de una mutación en alguno de los genes implicados en la forma hereditaria de EA (*APP*, *PSEN1* y *PSEN2*).

En el año 2011, el *National Institute of Aging* y la *Alzheimer's Association* (NIA-AA), publicaron una actualización de los criterios diagnósticos de la EA¹, donde se tienen en cuenta tanto criterios clínicos (deterioro cognitivo leve) como resultados positivos en biomarcadores en líquido cefalorraquídeo (LCR): $A\beta$ -42, proteína *tau* total (*tTau*) y *pTau*, o presencia de degeneración observada mediante técnicas de neuroimagen (RMN, PET amiloide y PET con marcaje con fluorodeoxiglucosa).

El estudio conjunto de estos biomarcadores ha permitido definir la enfermedad como un proceso biológico continuo (Figura 1) con una fase preclínica asintomática en la cual ya se observa daño neuronal, así como alteraciones en la estructura cerebral, gracias a las técnicas de imagen o al estudio de los biomarcadores en LCR, seguida de una fase prodrómica o inicial caracterizada por la presencia de deterioro cognitivo leve y de una fase de demencia donde los síntomas son más graves. Por lo tanto, la medida conjunta de estos marcadores en LCR permite tanto el diagnóstico temprano de la forma esporádica de EA como su identificación en la fase preclínica con una sensibilidad y especificidad superior al 85%.

• Biomarcadores de imagen

Las técnicas de neuroimagen suponen una forma eficiente y no invasiva de identificar alteraciones anatomopatológicas específicas de la EA y descartar otros trastornos. Son marcadores topográficos que se relacionan con la intensidad de la clínica ayudando a conocer la progresión de la enfermedad.

La resonancia magnética cerebral es la técnica de neuroimagen estructural de elección ya que permite evaluar el grado de atrofia cerebral del paciente.

La PET-FDG usa como trazador la fluorodeoxiglucosa, análogo de la glucosa y cuyo déficit en la captación indica una disminución del metabolismo de la glucosa, extrapolable a lesiones neuronales y disfunción sináptica en la EA. Un PET-FDG normal es prácticamente excluyente de enfermedad neurodegenerativa.

El PET amiloide aporta información del depósito de amiloide *in vivo*. El radiotrazador afín a β -amiloide se unirá a los acúmulos cerebrales de esta proteína si los hay. Figura 2.

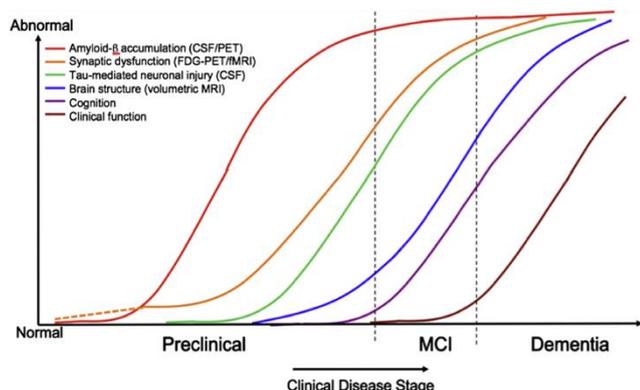


Figura 1. Modelo en el que se describe el proceso continuo de aparición de los distintos biomarcadores de EA y su evolución desde una fase preclínica hasta la fase de demencia. Tomado de: Reisa A Sperling, 2011.

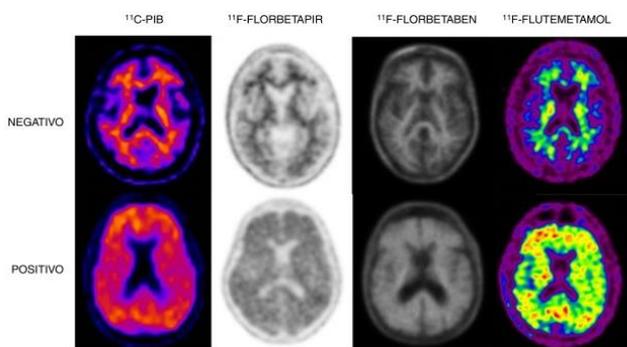


Figura 2. Imágenes PET negativas (fila superior) y positivas (fila inferior) para la presencia de placas de β -amiloide realizadas con distintos radiofármacos. Tomado de: Camacho V, 2018.

• Biomarcadores bioquímicos en LCR

El análisis de biomarcadores en LCR ha permitido el diagnóstico clínico-biológico de EA.

Los biomarcadores más estudiados son $A\beta$ -42, $A\beta$ -40, pTau y tTau.

Desde un punto de vista fisiopatológico, en enfermos de Alzheimer aparecen niveles reducidos de $A\beta$ -42 en LCR debido a que estos péptidos hidrofóbicos son secuestrados del espacio extracelular y del LCR en las placas amiloides cerebrales. Sin embargo, el péptido $A\beta$ -40 es el péptido amiloide más abundante en LCR encontrándose en concentraciones hasta 10 veces superiores que $A\beta$ -42. Es interesante incluir el estudio de $A\beta$ -40 porque, aunque su concentración no se encuentre alterada en EA, aporta un valor diagnóstico en aquellos casos en los que existe discrepancia entre los resultados de Tau y $A\beta$ -42. Por ejemplo, ante niveles de $A\beta$ -42 normales, si la ratio $A\beta$ -42/ $A\beta$ -40 está disminuida puede ser compatible con EA en pacientes con alta producción de amiloide. En cambio, ante niveles patológicos de $A\beta$ -42, si la ratio $A\beta$ -42/ $A\beta$ -40 está aumentada, es indicativo de un perfil de bajo productor amiloide.

Los niveles elevados de pTau y tTau se asocian a neurodegeneración y a la presencia de ovillos neurofibrilares.

La sensibilidad y especificidad para EA del estudio de estos biomarcadores es mayor del 85% tanto en la fase clínica de EA como en el estadio preclínico.

• Biomarcadores bioquímicos en sangre

Uno de los principales inconvenientes del estudio de biomarcadores en LCR es el carácter invasivo de la técnica, por lo que se están desarrollando distintos biomarcadores en sangre. Entre ellos se encuentran la cuantificación de pTau, $A\beta$ -42 y la subunidad ligera de los neurofilamentos (NfL).

Se ha visto que la medida de pTau permite detectar la enfermedad y diferenciarla de otras enfermedades neurológicas que cursen con los mismos síntomas. Esta se eleva en sangre en las fases preclínicas de la EA siendo un biomarcador prometedor en el cribado de pacientes para ensayos clínicos y como predictor del pronóstico de EA.

Diferentes estudios han demostrado una buena correlación entre los niveles plasmáticos de $A\beta$ -42 y los niveles en LCR, así como los depósitos cerebrales reflejados en el PET. Sin embargo, el estudio de este biomarcador de momento se realiza por técnicas complejas que aún no pueden aplicarse en la práctica clínica diaria.

Por último, NfL es un marcador de neurodegeneración, inespecífico pero muy sensible, que proporciona información sobre el estadio de la enfermedad y su pronóstico.

TRATAMIENTO

- **Tratamiento farmacológico**

Se ha demostrado que los síntomas de la EA se deben a un déficit de acetilcolina y a un incremento de los efectos excitatorios del glutamato.

Debido a ello, se emplean fármacos inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, como donazepilo, galantamina y rivastigmina, que retardan la degradación de acetilcolina mejorando el estado de alerta, la capacidad para realizar actividades de la vida diaria y los síntomas psicológicos y conductuales de la enfermedad. También se emplean fármacos antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA, como la memantina, que mejora el estadio clínico global, la cognición y las alteraciones conductuales.

- **Intervenciones cognitivas**

Intervenciones no farmacológicas focalizadas en la estimulación cognitiva, como la logopedia para mejorar los trastornos de la comunicación, la fisioterapia para mejorar la motricidad, la psicoterapia para tratar problemas de emoción como depresión o ansiedad, ó la terapia ocupacional que entrenará las actividades básicas de la vida diaria. Es además especialmente importante el apoyo a cuidadores y familiares, ayudándoles a gestionar el estrés y educándoles en la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Jack CR Jr, Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):257-62

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Barragán D, García MA, Parra A, Tejeiro J. Enfermedad de Alzheimer. *Medicine*. 2019;12(74):4338-46
- Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Tredici KD. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol*. 2006;112(4):389-404
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-59
- Camacho V, Gómez-Grande A, Sopena P, García-Solís D, Gómez-Río M, Lorenzo C, et al. PET amiloide en enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*. 2018;37(6):397-406
- Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol*. 2009;11(7):909-13
- Falcon B, Cavallini A, Angers R, Glover S, Murray TK, Barnham L, et al. Conformation determines the seeding

potencies of native and recombinant Tau aggregates. *J Biol Chem*. 2015;290(2):1049-1065

- Guías diagnósticas y terapéuticas de la Sociedad Española de Neurología. 2018.
- Mattsson N, Cullen NC, Andreasson U, Zetterberg H, Blennow K. Association between longitudinal plasma neurofilament light and neurodegeneration in patients with Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 2019;76(7):791-9.
- Pérez DA. ¿Cuándo debemos pedir un estudio genético en un paciente con sospecha de enfermedad de Alzheimer? En: Pérez Martínez DA, Berbel García A. 60 cuestiones prácticas en Neurogeriatria. Madrid: Saned; 2008. p. 11-14.
- Pérez-Mediavilla A, González A, Martínez E, Musgueta P, Restituto P, et al. Bases moleculares de las enfermedades neurodegenerativas. En: González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 3ª ed. Barcelona: Elsevier; 2019. p. 1690-737.
- Preische O, Schultz SA, Apel A, Kuhle J, Kaeser SA, Barro C, et al. Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2019;25(2):277-83.
- Proaño J, Aguilar F. Enfermedad de Alzheimer. Clínica, diagnóstico y neuropatología. *Plast Rest Neurol*. 2004;3(1-2):95-105.
- Roche. Elecsys Phospho-Tau (181P) CSF. [Internet]. Mannheim: Roche; 2018 [Consultado 10 Nov 2020]. Disponible en: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/08fb329b-e639-e811-f092-00215a9b3428?countryIsoCode=es>
- Roche. Elecsys Total-Tau CSF. [Internet]. Mannheim: Roche; 2018 [Consultado 27 Jul 2021]. Disponible en: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/257e246c-e539-e811-f092-00215a9b3428?countryIsoCode=es>
- Roche. Elecsys β -Amyloide (1-42) CSF. [Internet]. Mannheim: Roche; 2019 [Consultado 27 Jul 2021]. Disponible en: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/d0448732-5120-ea11-fa90-005056a772fd?countryIsoCode=es>
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):280-92.

ENFERMEDADES DE DEPÓSITO LISOSOMAL

Autores: Ylenia Pérez Arnaiz; Ilenia Liria González

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

Palabras clave: Depósito lisosomal, Metabolopatías

INTRODUCCIÓN

Los lisosomas son orgánulos intracelulares citoplasmáticos que se encuentran en todas las células nucleadas, especialmente en células con función fagocítica. Su cometido principal es la degradación de macromoléculas de procedencia extracelular e intracelular. Esta degradación se lleva a cabo gracias a que estos orgánulos son ricos en unas enzimas llamadas hidrolasas, existiendo hasta 50-60 hidrolasas diferentes. Una de las condiciones necesarias para el correcto funcionamiento de estas enzimas es el pH ácido del medio, por ello se conocen como hidrolasas ácidas.

Las enfermedades de depósito lisosomal (EDL) o enfermedades lisosomales son trastornos hereditarios monogénicos que se pueden originar por alteraciones en la síntesis o en la función de una de estas hidrolasas ácidas, aunque también pueden deberse a defectos o alteraciones de una proteína lisosómica necesaria para la biogénesis o el funcionamiento normal de los lisosomas. En consecuencia, los sustratos no se degradan correctamente y se acumulan dentro del lisosoma dando lugar a un daño crónico progresivo de distintos órganos y tejidos.

Son consideradas enfermedades raras ya que se han descrito alrededor de 50 EDL presentando una incidencia conjunta de 1 caso de cada 7000 nacidos vivos. Estas enfermedades presentan distribución panétnica a pesar de la mayor prevalencia de algunas de ellas en determinados grupos étnicos como los judíos ashkenazis.

Las EDL no suelen manifestarse en el momento del nacimiento. Los síntomas aparecen de forma progresiva y variable al ir acumulándose el material no degradado en los diferentes tejidos, presentando un espectro sintomático amplio.

La mayoría de las alteraciones lisosomales afectan a procesos catabólicos por lo que se agrupan convencionalmente bajo los nombres químicos de los sustratos no degradados que se acumulan (Tabla 1).

CAUSAS GENÉTICAS

Las EDL presentan un patrón de herencia autosómica recesiva con excepción de las enfermedades de Danon, Hunter y Fabry que se heredan ligadas al cromosoma X.

Estas enfermedades son normalmente monogénicas, es decir, están causadas por mutaciones en un solo gen, aunque la variedad de mutaciones entre distintos pacientes es elevada. El resultado final de estas mutaciones puede ser la pérdida completa de la actividad enzimática o una pérdida parcial, existiendo en algunos casos, cierta actividad residual.

La causa de la mayoría de las EDL son mutaciones en el gen que codifica la enzima dando lugar a un déficit enzimático o a una baja actividad residual. Sin embargo, también pueden darse mutaciones en genes implicados en el correcto funcionamiento de estas hidrolasas como, por ejemplo, en genes que codifican proteínas activadoras de la actividad hidrolítica de la enzima lisosomal (enfermedad de Gaucher por mutaciones en saposina C), mutaciones en genes que codifican transportadores de la membrana lisosomal (cistinosis) o mutaciones en genes que codifican proteínas necesarias para la función del lisosoma (enfermedad de Danon). Estas enfermedades también pueden darse por alteraciones post-traduccionales debido a anomalías en el plegamiento de las enzimas en el retículo endoplásmico o en la glucosilación de estas en el aparato de Golgi. Asimismo, pueden ser causadas por un defecto enzimático debido a la inestabilidad de la enzima en el lisosoma al no formarse el complejo multienzimático correspondiente.

Además, hay que tener en cuenta que una única alteración puede provocar déficits de varias enzimas.

ESFINGOLIPIDOSIS

Los esfingolípidos son un tipo de lípidos formados por una molécula de ceramida y un grupo polar (Figura 1).

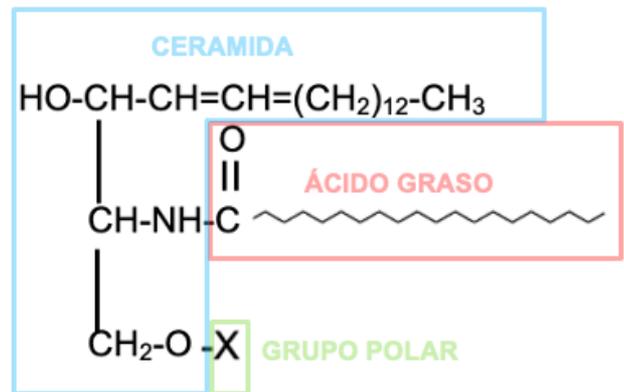


Figura 1. Estructura química de los esfingolípidos.
Elaboración propia.

La ceramida es una molécula formada por esfingosina (aminoalcohol insaturado de 18 carbonos) y un ácido graso de cadena larga unida a esta a través de un enlace amida. El grupo polar se une a través del alcohol primario y puede ser un azúcar o un alcohol, dando lugar a los distintos tipos de esfingolípidos: esfingomielinas, cerebrósidos, globósidos y gangliósidos, formando parte estos tres últimos del grupo de los glucoesfingolípidos.

Los esfingolípidos son componentes esenciales de las membranas celulares localizándose en prácticamente todos los tejidos del organismo, aunque en distintas proporciones

(Tabla 1). Son especialmente importantes en las vainas de mielina del sistema nervioso central donde contribuyen a que tenga lugar una correcta sinapsis neuronal.

Esfingolípidos	Grupo polar	Localización
Esfingomielinas	Fosfocolina o fosfoetanolamina	Especialmente abundantes en la vaina de mielina
Cerebrósidos	Un monosacárido: galactosa o glucosa	Membranas de tejidos nerviosos (galactosa) y no nerviosos (glucosa)
Globósidos	Dos o más azúcares: D-glucosa, D-galactosa o N-acetilgalactosamina	Membranas de eritrocitos, miocitos, células endoteliales, hígado, riñón, bazo
Gangliósidos	Oligosacáridos + uno o varios residuos del ácido siálico N-acetilneuramínico (NANA)	Abundantes en células del tejido nervioso

Tabla 1. Clasificación de esfingolípidos según grupo polar.

Adaptado de: González Hernández *et al.*, 2019.

Las esfingolipidosis son enfermedades hereditarias derivadas de fallos en el metabolismo de esfingolípidos, acumulándose en el interior de los lisosomas. Se clasifican en función de la enzima deficitaria (Tabla 2). Suelen cursar con importantes alteraciones neurológicas debido a la elevada concentración de esfingolípidos en el sistema nervioso central.

Enfermedad	Enzima deficitaria	Material acumulado
Gaucher	Glucocerebrosidasa Saposina C (proteína activadora)	Glucosilceramida
Niemann Pick (A y B)	Esfingomielinasa	Esfingomielina
Krabbe	Galactosilceramidasa	Galactosilceramida
Fabry	Galactosilceramidasa	Globotriaosilceramida
Leucodistrofia metacromática	Arlsulfatasa A	Sulfátidos

Gangliosidosis GM1	Galactosidasa	Gangliósidos GM1
Gangliosidosis GM2 <i>Tay-Sachs</i> <i>Sanghoff</i> <i>Deficiencia del activador GM2</i>	Hexosaminidasa A Hexosaminidasas A y B Proteína activadora de hexosaminidasa	Gangliósidos GM2 y glucolípidos relacionados

Tabla 2. Clasificación de las esfingolipidosis en función de la enzima deficitaria. Adaptado de: González Hernández *et al.*, 2019.

- **Enfermedad de Gaucher:**

La enfermedad de Gaucher es el trastorno más frecuente dentro de las EDL. Fue descrita por primera vez en 1882 por Philippe C.E. Gaucher. Se transmite de forma autosómica recesiva y tiene lugar debido a mutaciones en el gen *GBA* que codifica la enzima glucocerebrosidasa o en el gen *PSAP* que codifica su proteína activadora, la saposina C.

La enzima lisosomal glucocerebrosidasa cataliza la hidrólisis del glucocerebrósido glucosilceramida en glucosa y ceramida. En la enfermedad de Gaucher, el defecto funcional de esta enzima conlleva a un acúmulo de glucosilceramida en el interior lisosomal de los macrófagos dando lugar a lo que se conoce como células de Gaucher que desplazarán a las células normales en la médula ósea, bazo, hígado, pulmón y, en los tipos neuropáticos de la enfermedad, en el sistema nervioso central. Esto conduce a la aparición de hepatomegalia, esplenomegalia, anemias, trombopenia, afectación pulmonar con clínica de disnea, hipertensión pulmonar e incluso fallo pulmonar, trastornos esqueléticos como osteonecrosis, osteopenia y la deformación en matraz de Erlenmeyer, característica de la enfermedad de Gaucher (Figura 2).

La enfermedad de Gaucher se ha subdividido en varias formas clínicas:

- Tipo I, fenotipo crónico no neuropático o forma del adulto. Es la forma más frecuente de la enfermedad con un 94% de prevalencia sobre todo entre judíos ashkenazis, donde la incidencia asciende a 1 de cada 855 nacidos vivos. No presenta manifestaciones neurológicas ya que no hay afección del sistema nervioso central, pero sí presenta alteración hepática, esplénica y ósea. La edad de aparición de la clínica es variada pudiendo permanecer asintomáticos hasta edades avanzadas. Es esencial el diagnóstico temprano de la enfermedad para el correcto manejo del tratamiento ya que el retraso prolongado de este puede provocar problemas clínicos graves e irreversibles.
- Tipo II o fenotipo neuropático infantil agudo. Es la forma más rara y más grave de la enfermedad de Gaucher ya que los síntomas aparecen a los pocos meses de vida provocando un rápido y progresivo deterioro neurológico que conllevará a la muerte antes de los dos años de vida.

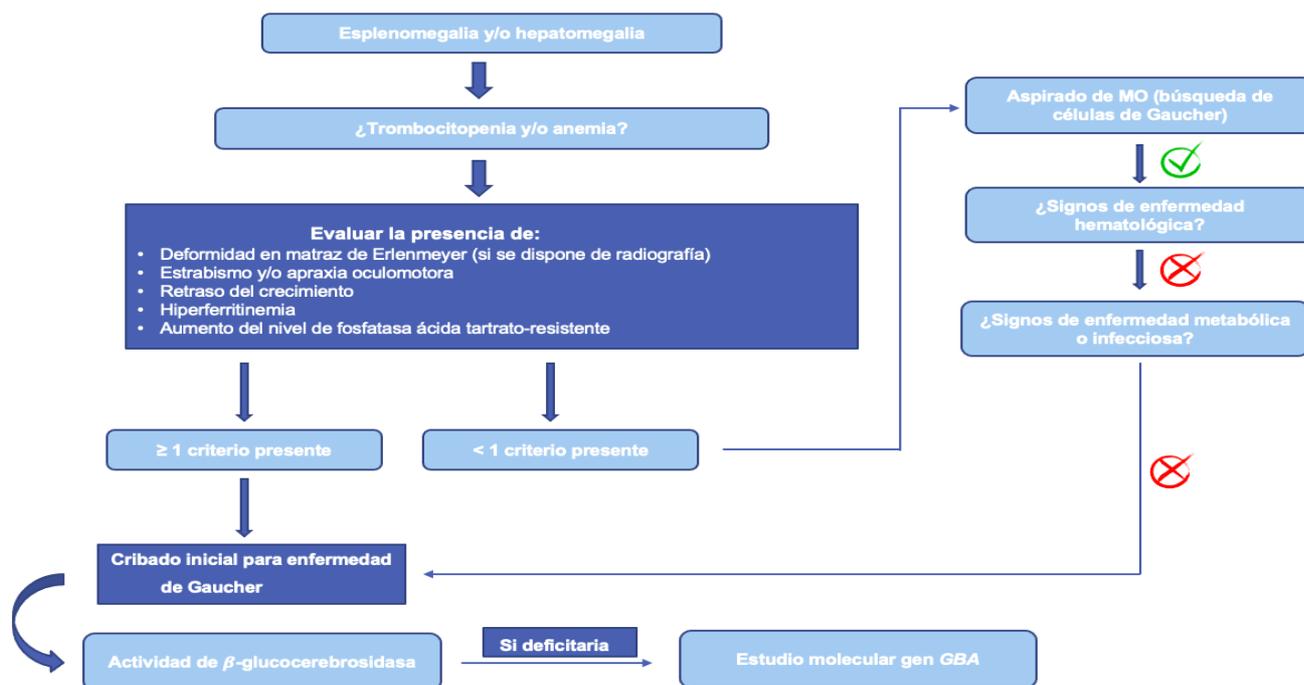


Figura 2. Algoritmo diagnóstico de enfermedad de Gaucher. Elaboración propia.

- Tipo III o fenotipo neuropático juvenil subagudo. Se trata de una forma intermedia de los dos fenotipos anteriores con un debut más tardío y variable.

Para realizar el diagnóstico de la enfermedad de Gaucher es indispensable la determinación de la actividad enzimática de la β -glucocerebrosidasa. Si esta es deficiente, se debe realizar el estudio molecular de mutaciones en el gen *GBA* para establecer una correlación genotipo-fenotipo y así poder ofrecer a la familia un estudio de portadores y diagnóstico prenatal.

Además, existen biomarcadores útiles al diagnóstico para evaluar la situación basal del paciente y poder monitorizar la enfermedad de forma adecuada. Entre ellos encontramos:

- Actividad de quitotriosidasa: esta enzima se secreta específicamente por los macrófagos activados en procesos crónicos y en concreto por los macrófagos cargados de lípidos presentes en la enfermedad de Gaucher, donde se ve aumentada hasta 600 veces con respecto a controles sanos. Es uno de los biomarcadores más útiles para la monitorización de la intervención terapéutica debido a su normalización si el tratamiento es efectivo.
- CCL18: quimiocina secretada por los macrófagos cargados de glucosilceramida. La monitorización de CCL18 en plasma es útil para determinar la eficacia terapéutica, especialmente en pacientes con actividad de quitotriosidasa reducida.
- Liso-Gb1 (glucosilesfingosina): la determinación de la concentración de liso-Gb1 se emplea como prueba de seguimiento de la progresión de la enfermedad o para monitorizar la eficacia de respuesta al tratamiento. En caso de tratamiento con terapia de reemplazo enzimático, es un buen biomarcador para la determinación de la dosis terapéutica para cada individuo.

• Enfermedad de Niemann-Pick:

La enfermedad de Niemann-Pick fue descrita por primera vez en 1914 por el pediatra Albert Niemann y en 1927, Ludwig Pick la diferenció de otras enfermedades como la enfermedad de Gaucher, considerándola una entidad propia.

Presenta un patrón de herencia autosómica recesiva. La mutación en el gen *SMPD1* que codifica la enzima esfingomielinasa ácida da lugar a las enfermedades de Niemann-Pick tipo A y tipo B. La esfingomielinasa ácida cataliza la hidrólisis de esfingomielina a ceramida y fosforilcolina por lo que en estos subtipos de la enfermedad se produce la acumulación de esfingomielina en los lisosomas de los macrófagos.

Además, también es conocida la enfermedad de Niemann-Pick tipo C que, en este caso, no está producida por un defecto enzimático si no por un trastorno en el transporte de lípidos conllevando a la acumulación de esfingomielina y colesterol en los lisosomas.

La acumulación de esfingomielina se da en el sistema monocito-macrófago de distintos órganos como hígado, bazo y pulmones provocando hepatomegalia, cirrosis hepática, esplenomegalia y pancitopenias. Es bastante común la aparición de un halo rojizo cerca de la mácula ocular y, además, puede afectar al sistema nervioso deteriorando las capacidades intelectuales.

Como se ha indicado anteriormente, existen tres tipos de enfermedad de Niemann-Pick:

- Niemann-Pick A: es la forma más grave de la enfermedad apareciendo en los primeros meses de vida y provocando la muerte del paciente a los 2-3 años de edad. Cursa con hepatoesplenomegalia, degeneración neurológica, retraso psicomotriz y fallo de medro, entre otras. El único tratamiento que se puede administrar para este fenotipo es sintomático.

- Niemann-Pick B: forma no neuropática. Presentación y curso variable que puede aparecer tanto en niños como en adultos. Entre los síntomas aparecen hepatomegalia, esplenomegalia y afectación macular.
- Niemann-Pick C: variante neuropática con degeneración neurológica de progresión lenta.

Para el diagnóstico de la enfermedad de Niemann-Pick tipo A y B es imprescindible realizar la determinación de la actividad de la enzima esfingomielinasa ácida. En caso de déficit enzimático, se realiza el estudio molecular del gen *SPMD1*. Es posible realizar diagnóstico prenatal de Niemann-Pick A y Niemann-Pick B determinando la actividad enzimática en amniocitos o microvellosidades coriónicas.

• Enfermedad de Fabry:

La enfermedad de Fabry fue descrita por primera vez en 1898 por Johann Fabry y William Anderson. Presenta una incidencia de 1 cada 100000 nacidos vivos y un patrón de herencia autosómico recesivo ligado al cromosoma X. Es una enfermedad causada por hasta 1000 mutaciones distintas en el gen *GLA* que codifica la enzima α -galactosidasa A. Esta enzima cataboliza el esfingolípido globotriaosilceramida en galactosa y globósido por lo que un déficit de esta conlleva a la acumulación de globotriaosilceramida en los lisosomas, principalmente de células endoteliales vasculares, provocando la liberación de especies reactivas de oxígeno y la disregulación de la producción de óxido nítrico dando lugar a una disfunción endotelial en diferentes órganos y tejidos. Por otro lado, cabe destacar que la acumulación de este esfingolípido ocasiona una elevación de liso-Gb3, uno de sus metabolitos, que estimula la proliferación de células musculares lisas de la pared vascular, aumentando el grosor del endotelio. Esto disminuye la luz de los vasos sanguíneos favoreciendo eventos trombóticos.

La sintomatología de la enfermedad de Fabry es muy variada. De forma temprana, se manifiesta con alteraciones en nervios periféricos y la piel como acroparestesias, intolerancias a los cambios térmicos o al ejercicio físico, angioqueratomas o hipohidrosis. Entre el 2% y el 14% de los pacientes afectados, presentan el fenotipo de la llamada forma clásica de la enfermedad de Fabry que incluye manifestación multiorgánica con afectación cardíaca, del sistema nervioso central y nefropatía de Fabry (proteinuria, hematuria e insuficiencia renal crónica).

La enfermedad se diagnostica de forma tardía y, para establecer un diagnóstico definitivo, es necesario que la actividad de la enzima α -galactosidasa A se encuentre disminuida. Ante una actividad deficiente de esta, se procede al estudio de las mutaciones del gen *GLA*. La determinación de liso-Gb3 en plasma y orina es útil ya que la exposición a niveles elevados de este metabolito correlaciona con la gravedad de la enfermedad.

MUCOPOLISACARIDOSIS

Los glucosaminoglucanos (GAGs), también conocidos como mucopolisacáridos, son heteropolisacáridos presentes en la matriz extracelular de diferentes tejidos. Estructuralmente,

son polímeros compuestos de unidades repetidas de disacáridos. Este disacárido está formado por un ácido hexurónico, bien ácido D-glucurónico o ácido L-idurónico, y una hexosamina, que puede ser N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina, o uno de sus derivados (Figura 3).

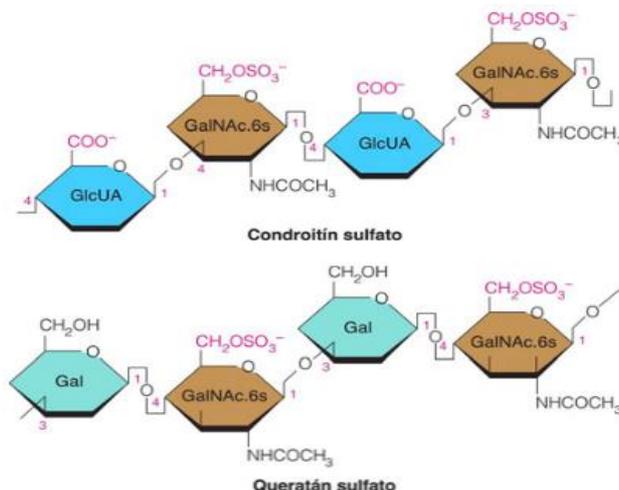


Figura 3. Estructuras repetidas de los disacáridos que forman los glucosaminoglucanos condroitín sulfato y queratán sulfato. Tomado de: Mathews CK, 2013.

En función de qué monosacáridos formen este disacárido, se hablará de uno u otro mucopolisacárido (Tabla 3).

GAGs	Composición	Localización
Ácido hialurónico	Ácido glucurónico + N-acetil-glucosamina	Líquido sinovial, humor vítreo
Condroitín sulfato	Ácido glucurónico + N-acetil-galactosamina	Tejido conjuntivo (cartílago, tendones, ligamentos)
Heparán sulfato	Ácido idurónico o glucurónico + glucosamina sulfatada o acetilada	Membranas basales, componentes de las superficies celulares
Heparina	Forma fraccionada del heparán sulfato	Anticoagulante
Dermatán sulfato	Ácido idurónico + N-acetil-galactosamina	Piel, paredes arteriales y válvulas cardíacas
Queratán sulfato	Galactosa + N-acetil-galactosamina	Tejido conjuntivo (córnea, cartílago y discos intervertebrales)

Tabla 3. Clasificación de mucopolisacáridos o GAGs en función de su composición. Adaptado de: Mathews CK, 2013.

Según la enzima deficitaria se pueden clasificar las mucopolisacaridosis en hasta 7 tipos (Tabla 4).

Enfermedad	Enzima deficitaria	Material acumulado
I (síndromes de Hurler, Scheie y Hurler-Scheie)	Iduronidasa	Dermatán sulfato Heparán sulfato
II (síndrome de Hunter)	Iduronidato-2-sulfatasa	Dermatán sulfato Heparán sulfato
III (síndrome de Sanfilippo) A B C D	Heparán-N-sulfatasa N-acetilglucosaminidasa Glucosamina-N-acetiltransferasa N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparán sulfato
IV (síndrome de Morquio) A B	Galactosa-6-sulfatasa Galactosidasa	Queratán sulfato Condroitín sulfato
VI (síndrome de Maroteaux-Lamy)	Arilsulfatasa B	Dermatán sulfato
VII (síndrome de Sly)	Glucuronidasa	Dermatán sulfato Heparán sulfato
IX	Hialuronidasa	Ácido hialurónico

Tabla 4. Clasificación de las mucopolisacaridosis en función de la enzima deficitaria. Adaptado de: González Hernández *et al.*, 2019.

Todas ellas comparten entre sí muchas características clínicas con distinta gravedad desarrollándose los síntomas, generalmente, en la primera infancia. Entre estos aparecen problemas neurológicos que dependerán del tipo de mucopolisacaridosis, rasgos faciales toscos, afectación multisistémica, hepatoesplenomegalia, displasia esquelética o pérdida auditiva.

Tras sospechar de mucopolisacaridosis en el examen clínico del paciente, el primer paso para abordar el diagnóstico es la cuantificación de glucosaminoglucanos en orina. Si se confirma una excreción elevada de estos, se debe realizar un análisis diferencial para determinar el perfil de glucosaminoglucanos excretados y así orientar al ensayo enzimático concreto que se requiere para identificar el tipo de mucopolisacaridosis. Por último, es esencial realizar el estudio molecular del gen afecto.

GLUCOPROTEINOSIS

Las glucoproteínas son macromoléculas biológicas formadas por cadenas de oligosacáridos o polisacáridos unidas de forma covalente a proteínas que ejercen funciones diversas. Están presentes en la cara externa de la membrana plasmática formando parte de la glucocálix, en la matriz extracelular y en la sangre. También se pueden localizar en algunos orgánulos celulares como el aparato de Golgi y los lisosomas.

Las glucoproteinosis comprenden un grupo de enfermedades causadas por defectos en la degradación de glucoproteínas (Tabla 6)

Lo más habitual es que el déficit enzimático sea de enzimas que participan en la degradación de la parte oligosacáridica de la glucoproteína.

ENFERMEDAD DE POMPE O GLUCOGENOSIS TIPO II

La enfermedad de Pompe fue descrita por primera vez en 1932 por Joannes C. Pompe. Presenta una incidencia de 1 cada 40000 nacidos vivos y se hereda de forma autosómica recesiva. En este caso, se debe a mutaciones en el gen *GAA* que codifica para la enzima α -glucosidasa ácida encargada de hidrolizar a glucosa los enlaces (1-4) y (1-6) del glucógeno.

Se pueden encontrar tres fenotipos de la enfermedad:

- Infantil: actividad enzimática prácticamente ausente. Se manifiesta en el primer mes de nacimiento con síntomas como hipotonía grave, cardiomegalia, hepatomegalia que conlleva a la muerte del paciente antes de los dos años de vida.
- Juvenil: existe cierta actividad residual manifestándose los síntomas (debilidad muscular y afectación respiratoria) durante los primeros 10 años de vida.
- Adulto: actividad enzimática muy disminuida pero mayor que en la forma juvenil. Suele aparecer entre los 30 y 60 años. Los pacientes desarrollan hipotonía muscular de forma progresiva que afectará finalmente a los músculos respiratorios.

TRATAMIENTO DE LAS EDL

Actualmente existen varias terapias específicas autorizadas para el tratamiento de algunas de las EDL. Estos tratamientos tienen la finalidad de evitar el acúmulo de material no degradado para poder mejorar la sintomatología.

- Terapia enzimática sustitutiva (TES): consiste en infundir al paciente la enzima deficitaria resultando en la regresión de muchas de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Las ventajas de este tratamiento son el bajo riesgo para el paciente y su fácil administración. Sin embargo, es un tratamiento caro que ha de administrarse de forma continua debido a la corta vida

Enfermedad	Material acumulado	Enzima deficitaria	Síntomas
Fucosidosis	Fucosil-oligosacáridos (cerebro) Glucolípidos (hígado)	α -fucosidasa	Deterioro psicomotor, hipotonía, convulsiones, disostosis múltiple
α-manosidosis	Oligosacáridos ricos en manosa	α -manosidasa	Disostosis múltiple, sordera, rasgos faciales toscos, retraso motor, discapacidad intelectual moderada
β-manosidosis	Disacárido manosil-N-acetilglucosamina	β -manosidasa	Discapacidad intelectual profunda, sordera, dismorfia facial, angioqueratoma
Sialidosis o mucopolipidosis I	Sialiloligosacáridos	Glucoproteína sialidasa, o neuraminidasa	Mioclonías, tosquedad facial, pérdida de agudeza visual
Galactosialidosis	Oligosacáridos sialilados	Catepsina A (deficiencia de β -galactosidasa y sialidasa)	Edema, ascitis, displasia esquelética, visceromegalia
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosamina	1-aspatamido- β -N-acetilglucosamina amidohidrolasa	Hernia, diarrea recurrente, afasia progresiva, discapacidad intelectual
Enfermedad de Schindler	N-acetilgalactosamina-O-glucopéptidos trisacárido	A-N-acetilgalactosaminidasa	Retraso de desarrollo, ceguera cortical, mioclonías, hepatomegalia

Tabla 6. Clasificación de las glucoproteinosis en función de la enzima deficitaria, material acumulado y presentación clínica. Adaptado de: González Hernández *et al.*, 2019.

media de la enzima. Además, no atraviesa la barrera hematoencefálica por lo que sólo palia los síntomas somáticos, pero no los del sistema nervioso central y puede ser inmunogénico provocando una respuesta inmune en el organismo. Es muy eficaz para el tratamiento de las enfermedades de Gaucher tipo I y tipo III, Niemann-Pick tipo B y Fabry y para el tratamiento de algunos tipos de mucopolisacaridosis (I, II, IVA, VI y VII).

- Terapia de reducción de sustrato (TRS): en este caso se emplean fármacos que inhiben la producción del sustrato de la enzima deficitaria. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Gaucher, se emplean fármacos que inhiben la producción de glucosilceramida. Resulta eficaz para el tratamiento de las enfermedades de Gaucher tipo I y III y Niemann-Pick tipo C.
- Trasplante de células madre hematopoyéticas: se trata de un tratamiento permanente donde se dota al paciente de una población de células del donante con capacidad para producir la enzima deficitaria de forma continua. Además, en este caso, sí se corrigen tanto los síntomas

somáticos como la afectación del sistema nervioso central al atravesar la enzima la barrera hematoencefálica. Por el contrario, las principales desventajas son el riesgo de rechazo, de mortalidad y la dificultad para encontrar un donante compatible. Se trata del tratamiento idóneo para pacientes menores de 2 años afectados de alguna mucopolisacaridosis.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Boot RG, Verhoek M, Langeveld M, Renkema GH, Hollak C, Wening JJ, et al. CCL18: a urinary marker of Gaucher cell burden in Gaucher patients. *J Inher Metab Dis*. 2006; 29(4):564-71.
- Cooke DQ, Divall SA, Radovick S. Crecimiento normal y alterado en los niños. En: Melmed S, ed. *Williams. Tratado de endocrinología*. 13ª ed. Barcelona: Elsevier. 2016. p. 964-1073.
- Di Rocco M, Andria G, Deodato F, Giona F, Micalizzi C, Pession A. Early diagnosis of Gaucher disease in

- pediatric patients: proposal for a diagnostic algorithm. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(11):1905-9.
- González Hernández A, Alegre Martínez E, et al. Enfermedades lisosomales. En: González Hernández A, ed. *Principios de Bioquímica Clínica y Patología Molecular*. 2ª ed. Barcelona: Elsevier. 2014. p 355-364
 - Gort L, Coll MJ. Diagnóstico, biomarcadores y alteraciones bioquímicas de la enfermedad de Gaucher. *Med Clin (Barc)*. 2011;137:12-16.
 - Herrera Calvo JA. Nefropatía por enfermedad de Fabry. *Nefrología*. 2011;2(1):1-119.
 - Kishnani PS, Chen YT. Defectos del metabolismo de los hidratos de carbono. En: Kliegman RM, St. Geme J, Blum N, eds. *Nelson. Tratado de pediatría*. 21ª ed. Barcelona: Elsevier; 2020. 777-788.
 - Llorca IL, Noguera OV. Enfermedad de Gaucher: a propósito de un caso. *Rev Diagn Biol*. 2002; 51(3):100-4
 - Mathews CK. *Bioquímica*. 4ª ed. Madrid: Pearson. 2013.
 - Nelson DL. *Lehninger. Principios de Bioquímica*. 5ª ed. Barcelona: Omega. 2009.
 - Rosell MJC. Enfermedades por depósito en los lisosomas. En: Farreras Rozman. *Medicina Interna*. 19ª ed. Barcelona: Elsevier. 2020. p. 1786-1795.
 - Struyf S, Schutyser E, Gouwy M, Gijssbers K, Proost P, Benoit Y, et al. PARC/CCL18 is a plasma CC chemokine with increased levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol*. 2003; 163(5): 2065-75.
 - Vanier MT. Niemann-Pick diseases. En: *Manual de Neurología Clínica*. 3ª ed. Barcelona: Elsevier; 2013. p 1717-21.

BLOQUE II

SESIONES DE CALIDAD

ESPECIFICACIONES DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO

Autores: Daniel Párraga García; Olga Nerea Coya Linares

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

Palabras clave: Especificaciones de calidad, Control interno, Control externo

CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

El control de calidad analítico es la herramienta más importante de la que disponen los laboratorios para asegurar la calidad y fiabilidad de los resultados emitidos.

Es por ello que se emplean en la etapa inicial de todo proceso analítico. Se deben analizar antes de cada tanda analítica, tras las calibraciones y tras cambios de reactivo o cualquier otro suceso que haya podido alterar la práctica analítica diaria.

Existen diferentes tipos de controles de calidad, como veremos a continuación. Estos nos van a permitir calcular la medida de la precisión, la veracidad y la exactitud de nuestro método analítico.

Estos materiales de control deben presentar una serie de características que nos permitan usarlos con la seguridad de que nuestros resultados son fiables:

- Estabilidad. Sus valores deben ser constantes hasta la fecha de caducidad que se nos indique en el lote.
- Homogeneidad en la matriz de la muestra.
- Conmutabilidad. Se dice que un material estabilizado es conmutable con el suero humano cuando la relación entre los resultados obtenidos al analizar ambos especímenes por dos métodos analíticos es la misma para ambos¹.
- Diferentes niveles de concentración. Ya que nosotros emitiremos resultados a diferentes niveles de concentración, se deben pasar controles con valores que incluyan los órdenes de magnitud que vayamos a informar.
- Presentación. Los controles pueden presentarse liofilizados o líquidos. Los primeros tienen la ventaja de que normalmente su fecha de caducidad es mayor, si bien tienen el hándicap de que se deben reconstituir exactamente con el volumen de líquido indicado por el fabricante, añadiendo una fuente de error que los controles líquidos no tienen.

A continuación, vamos a ver los distintos tipos de control de calidad que podemos tener.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

En el mercado podemos encontrar controles con diferentes concentraciones. Se deben usar aquellos que sean más apropiados para los resultados que vamos a emitir, con órdenes de magnitud similares a los resultados más frecuentes y próximos a los puntos de corte de decisión clínica. En la figura 1 se muestra la gráfica de Levey-

Jennings para un control con los datos proporcionados por el fabricante antes del ajuste realizado por el laboratorio y después del ajuste.

Los controles internos tienen una concentración conocida. La concentración aproximada viene dada por el fabricante, si bien es el laboratorio el que deberá obtener el valor exacto tras varias repeticiones del mismo y calcular su propio coeficiente de variación.

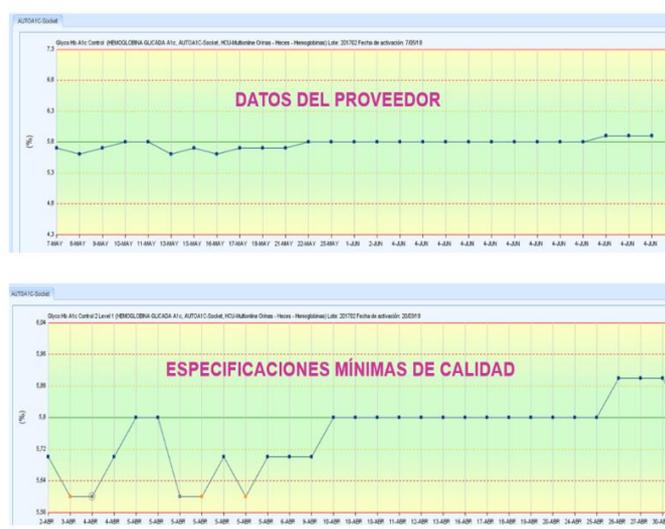


Figura 4. Gráfica de Levey-Jennings con valores del fabricante y después de ajustar con la imprecisión del laboratorio. Elaboración propia.

La utilidad principal es doble:

- Por un lado, permite aceptar o rechazar series analíticas (Correcciones inmediatas) para poder emitir en nuestro día a día resultados fiables. En la figura 2 se muestra un ejemplo de cómo veríamos el control interno, con las desviaciones estándar definidas por el laboratorio y los valores límites o valores de alarma ante los cuales se debe ver qué ocurre con el método, y si debemos intervenir antes de empezar a emitir resultados.

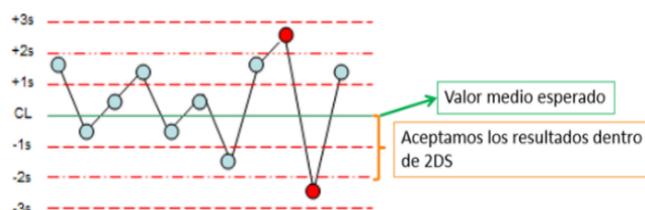


Figura 3. Gráfica de Levey-Jennings para la validación de la serie analítica diaria. Elaboración propia.

- Por otro lado, como el valor del fabricante no es exacto, no nos va a permitir calcular el sesgo que tienen nuestros equipos. Lo que si nos va a ayudar es a conocer la imprecisión de nuestro método ya que, si cumplen con las características de estabilidad, homogeneidad y conmutabilidad, podremos saber si nos alejamos de nuestra propia media para poder realizar acciones correctivas. Más adelante trataremos el tema de la imprecisión y exactitud analíticas.

Así pues, los controles internos deben revisarse diariamente para validar series analíticas, y controlar la imprecisión del método al menos de manera mensual.

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

Estos controles se comercializan con diferentes niveles, si bien no se conoce dicho valor antes de su análisis.

El objetivo es que varios laboratorios analicen el mismo control externo, de manera que el valor verdadero del mismo será considerado como el promedio del valor de todos los laboratorios que lo analizan.

Los controles son comercializados por entidades externas independientes a los laboratorios como pueden ser la SEQC, UK-NEQAS (Figura 3), etc.

La utilidad principal de dichos controles es la de conocer cómo trabaja nuestro equipo y corregir posibles errores de sesgo a largo plazo cuando se detecten desviaciones significativas de la media de todos los laboratorios. En este caso la revisión periódica puede ser mensual, trimestral o incluso semestral, ya que de ella no depende que la serie analítica del día salga con una cierta fiabilidad.

ESPECIFICACIONES DE CALIDAD

Las especificaciones de calidad son valores cuantitativos en forma de requisito metrológico que el laboratorio debe cumplir para garantizar que sus prestaciones son las adecuadas para un objetivo dado. Se pueden presentar en tres formas:

- Error máximo permitido
- Imprecisión máxima permitida
- Sesgo máximo permitido

La imprecisión se refiere al grado de dispersión con que nuestro método aporta resultados, se trata de un error que se produce de manera aleatoria. Usando el ejemplo de la diana, donde el centro de la misma es el valor verdadero, un método con poca precisión, al repetir una misma muestra varias veces, daría en distintos puntos de la diana siempre alrededor del valor verdadero.

El sesgo hace referencia a una desviación del valor verdadero siempre del mismo orden de magnitud y de manera sistemática. En el ejemplo de la diana, ahora los resultados no estarían dispersos alrededor de la misma, si no concentrados todos en un punto, si bien dicho punto sí que estaría alejado del centro.

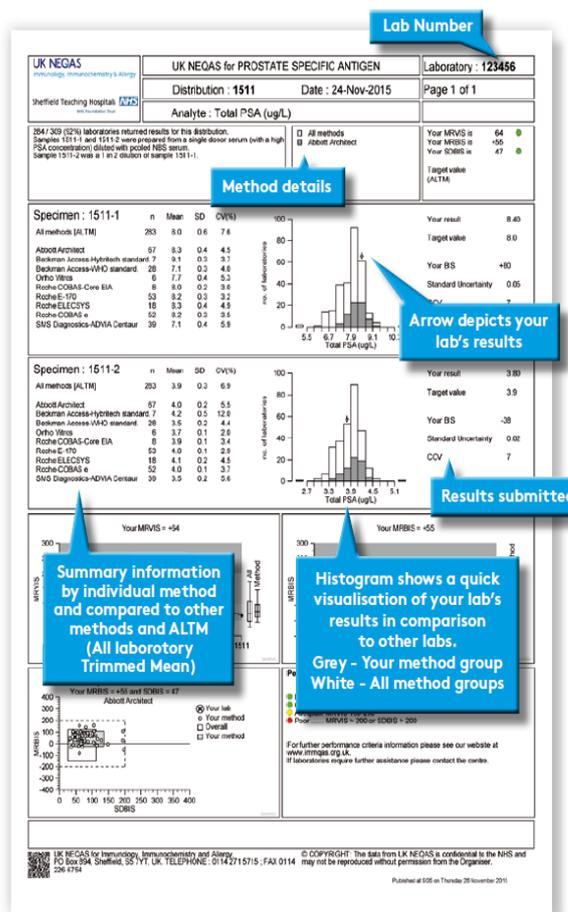


Figura 5. Ejemplo de informe de control externo. Extraído de la web de UK-NEQAS.

Así pues, el error total corresponde a la suma de ambos errores.

Para definir las especificaciones de calidad, debemos definir el error total basado en diferentes modelos que veremos a continuación, y asegurarnos de que nuestro método no supere dicho error previamente establecido.

En la Figura 4 se muestra el ejemplo de las dianas, con las fórmulas empleadas para el cálculo de la precisión y la veracidad o sesgo.



Figura 4. Dianas para plasmas con la definición de veracidad o sesgo e imprecisión. Fórmulas para el cálculo de las mismas. Elaboración propia.

Para definir las especificaciones de calidad, un grupo de expertos se ha reunido dos veces a lo largo de los últimos años.

La primera reunión se conoce como la Conferencia de Estocolmo de 1999, donde se definen las especificaciones

de calidad en base a ciertos criterios que se describen en la Figura 5. Dichos criterios están ordenados de manera jerárquica de mayor a menor criterio científico. Definen 5 modelos distintos de especificaciones de calidad.

Más tarde, en 2014 en Milán hay otra conferencia donde se establecen unas nuevas recomendaciones, simplificando los modelos establecidos de 5 a 3, ordenados igualmente de mayor a menor calidad científica.

MODELO PRIMERO. BASADO EN LA PRESTACIÓN ANALÍTICA

El modelo de máxima calidad, se basa en la evaluación del efecto de la respuesta analítica sobre los resultados clínicos en situaciones clínicas específicas.

Se debe desarrollar un tipo de estudio que incluya:

- La investigación del impacto del rendimiento analítico de la prueba **sobre el diagnóstico clínico** (estudios directos)
- Investigación del impacto del rendimiento analítico sobre pruebas de **clasificación o decisión clínica**, afectando a la probabilidad diagnóstica (estudios indirectos)

Este modelo, pese a su dificultad, se considera el *Gold Standard*.

MODELO SEGUNDO. BASADO EN LA VARIABILIDAD BIOLÓGICA

Este modelo está basado en la variación debida al equilibrio entre el recambio metabólico y la regulación homeostática. La variación de un analito dentro de un mismo individuo se matematiza con el estadístico coeficiente de variación

individual (CVi), y la variación del mismo analito entre un grupo de individuos cuyo estadístico es el coeficiente de variación de grupo (CVg).

Estos datos se estudian para un gran número de analitos, recopilando los valores de varios artículos científicos, libros, tesis etc. Así, se pueden obtener las especificaciones de calidad y establecer valores de referencia poblacionales.

En la Figura 6 se muestran los cálculos necesarios para conocer dichas especificaciones en base a este modelo de variabilidad biológica.

Dichas especificaciones incluyen criterios mínimos, deseables y óptimos y se pueden consultar en la web de la EFLM en el apartado de *Biological Variation* (<https://biologicalvariation.eu/>)

La sociedad científica SEQC ha agrupado en unas tablas estas especificaciones actualizado a fecha de 2020 donde resulta más sencillo su consulta. Se muestra el formato empleado en la Figura 7.

MODELO TERCERO. BASADO EN EL ESTADO DEL ARTE

Es el modelo de menor calidad, ya que no está basado en evidencias científicas.

Se obtienen al extraer información (metrológica), del conjunto formado por un grupo de laboratorios que utilizan un mismo (o similar) producto de diagnóstico *in vitro*, ya sea por datos extraídos de programas externos de calidad o de las publicaciones actuales sobre metodología. Se definen en base a dos factores:

- Factor resultado: Se define el número de resultados que representan el estado del arte y se fija la

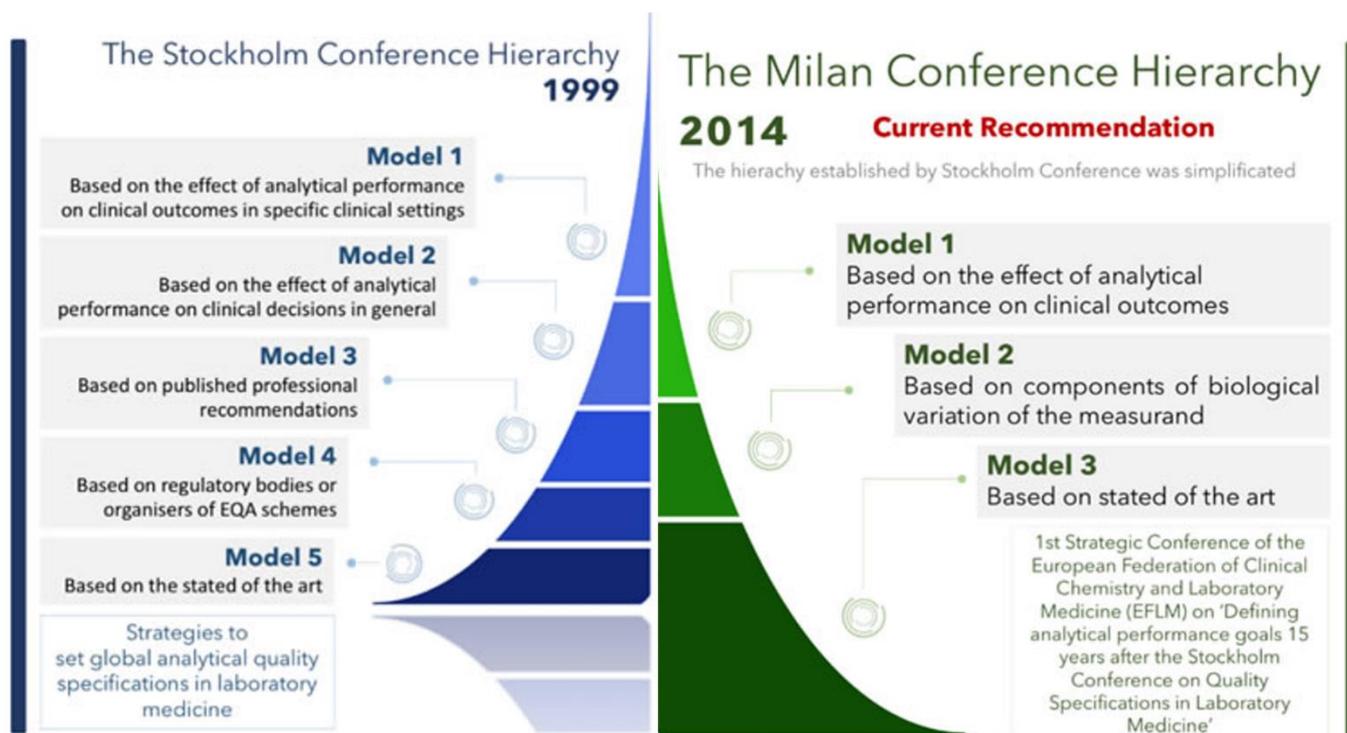


Figura 5. Modelos de especificaciones de calidad. Tomado de: AEBM (Labmed at a Glance).

Criterio	Precisión máxima admitida (en %)	Sesgo máximo permitido (en %)	Error máximo permitido
Mínima	$< 0,75CV_{bi}$	$< 0,375 ((CV_{bi})^2 + (CV_{bg})^2)^{1/2}$	$z 0,75CV_{bi} + 0,375 ((CV_{bi})^2 + (CV_{bg})^2)^{1/2}$
Deseable	$< 0,50CV_{bi}$	$< 0,25 ((CV_{bi})^2 + (CV_{bg})^2)^{1/2}$	$z 0,50CV_{bi} + 0,250 ((CV_{bi})^2 + (CV_{bg})^2)^{1/2}$
Óptima	$< 0,25CV_{bi}$	$< 0,125 ((CV_{bi})^2 + (CV_{bg})^2)^{1/2}$	$z 0,25CV_{bi} + 0,125 ((CV_{bi})^2 + (CV_{bg})^2)^{1/2}$

Pudiendo ser $z=1,65$ para $\alpha=0,05$, $z=1,96$ para $\alpha=0,025$ y $z=2,33$ para $\alpha=0,01$

Figura 6. Cálculo del error máximo permitido por el modelo de variabilidad biológica. Criterio mínimo, deseable y óptimo. Elaboración propia.

especificación de forma que ese número de resultados este dentro de la misma.

- **Factor laboratorio:** Se identifica qué porcentaje de laboratorios (%X) son capaces de entregar un porcentaje de sus resultados (%Y) dentro de un error total máximo determinado.

Se pueden realizar gráficas del estado del arte, donde se muestra el porcentaje de laboratorios que cumplen las especificaciones en función del porcentaje de resultados que son capaces de tener dentro de las especificaciones definidas.

Utilizando una mezcla entre el factor resultado y el factor laboratorio, en España, el Comité de Expertos Interdisciplinarios sobre Especificaciones de la Calidad (CEIEC) ha definido un grupo de especificaciones mínimas

obtenidas de forma que el 90% de los laboratorios sean capaces de tener el 75% de sus resultados del Programa de Intercomparación dentro de esa especificación. Este documento se puede consultar en las webs de las sociedades científicas AEFA, AEBM, SEQC Y SEHH.

Por último, para finalizar el tema comentar que en otros países como Alemania, Rusia, o EEUU, las especificaciones basadas en el estado del arte vienen determinadas por ley y son de obligado cumplimiento para cualquier laboratorio clínico.

Sistema	Magnitud	Variación Biológica		Especificaciones óptimas		
		CV _i	CV _G	CV(%)	ES(%)	ET(%)
Srm-	α 1- Glicoproteína ácida	11,30	24,90	2,8	3,4	8,1
Srm-	α -Amilasa	8,70	28,30	2,2	3,7	7,3
Uri-	α -Amilasa	94,00	46,00	23,5	13,1	51,9
Uri-	α -Amilasa pancreática	69,50	105,00	17,4	15,7	44,4
Srm-	α -Fetoproteína	12,20	45,60	3,1	5,9	10,9
Srm-	Alanina aminotransferasa (ALT)	19,40	41,60	4,9	5,7	13,7
Uri-	Albumina	35,00	35,00	8,8	6,2	20,6

Sistema	Magnitud	Número de separatas	Variación biológica		Especificaciones deseables		
			CV _i	CV _G	CV(%)	ES(%)	ET(%)
Srm-	11-Desoxicortisol	2	21,30	31,50	10,65	9,51	27,08
Srm-	17-Hidroxiprogesterona	2	19,60	50,40	9,80	13,52	29,69
Uri-	4-hidroxi-3-metoximandelato (AVM)	1	22,20	47,00	11,10	12,99	31,31
Srm-	5' Nucleotidasa	2	23,20	19,90	11,60	7,64	26,78
Uri-	5-Hidroxiindolacetato	1	20,30	33,20	10,15	9,73	26,48
Srm-	α -Amilasa	7	8,70	28,30	4,35	7,40	14,58
Uri-	α -Amilasa	1	94,00	46,00	47,00	26,16	103,71

Sistema	Magnitud	Variación biológica		Especificaciones mínimas		
		CV _i	CV _G	CV(%)	ES(%)	ET(%)
Srm-	α 1-Antitripsina	5,90	16,30	4,4	6,5	13,8
Pla-	α 2-Antiplasmina	6,20	---	4,7	---	---

Figura 7. Tablas resumen de las especificaciones de la EFLM publicada en la SEQC. Fuente: <https://www.seqc.es/>

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Morancho Zaragoza J, Prada Medio E. Control interno de la calidad en procedimientos de medida cuantitativos. Madrid: Asociación Española del Laboratorio Clínico; 2021.
2. Pineda-Tenor D, Prada de Medio E, Prieto Menchero S. Especificaciones de calidad analítica. El Consenso de Milán 2014. Laboratory Medicine at a Glance. 2017;5:3-7

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. Programa de garantía externa de calidad [Internet]. Madrid: SEHH; 2022. Disponible en: <https://www.sehh.es/calidad/programa-de-garantia-externa-calidad>
- European Federation Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine. EFLM Biological variation Database [Internet]. Milano: EFLM; 2022. Disponible en: <https://biologicalvariation.eu/>
- Sociedad Española de Medicina de Laboratorio. Comisiones. Comisión de Calidad Analítica [Internet]. Barcelona: SEQC; 2022. Disponible en: <https://www.seqc.es/es/comisiones/comision-de-calidad-analitica/ id:4/>

DISTINTOS MODELOS DE ACREDITACIÓN EN INSTITUCIONES SANITARIAS EN TODO EL MUNDO

Autores: Daniel Párraga García; Olga Nerea Coya Linares

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

Palabras clave: Modelos de acreditación, Instituciones sanitarias, ISO, JCAHO, Certificación

INTRODUCCIÓN

La acreditación es el programa externo más conocido para establecer modelos de calidad. Más concretamente, la ISO 15189 de los laboratorios clínicos es la más utilizada dentro del ámbito español. No obstante, no hay un modelo único ni en cuanto a contenidos, ni en cuanto a los mecanismos de implementación.

Vamos a comenzar definiendo distintos términos para contextualizar los diferentes modelos de calidad que veremos a continuación:

- La certificación es “una acción llevada a cabo por una entidad reconocida como independiente de las partes interesadas mediante la que se manifiesta la conformidad, solicitada con carácter voluntario, de una determinada empresa, producto, proceso, servicio o persona con los requisitos definidos en las normas o especificaciones técnicas”.
- El concepto de acreditación es equivalente al de certificación sólo que aplicado fundamentalmente a organizaciones. Así pues, certificación puede ser de aplicación más amplia, incluyendo productos, servicios e incluso profesionales individuales. En el plano internacional, según las propias entidades normalizadoras, certificadoras y acreditadoras, hay dos características que diferencian la certificación y acreditación de la licencia o habilitación y la homologación
- La acreditación y la certificación son voluntarias y las llevan a cabo entidades independientes, a diferencia de lo que ocurre con la homologación y la licencia o habilitación que tienen carácter de obligatoriedad y las pueden realizar entidades ligadas a una de las partes.

Con relación a los programas internos de gestión de la calidad, los programas de acreditación pueden ser considerados como una actividad de monitorización; si bien para el entorno externo pueden tener diversas utilidades según los diversos puntos de vista de los profesionales, gestores, administración y la población

MODELOS DE ACREDITACIÓN

Los “modelos” que más se suelen citar son el “modelo ISO”, el “modelo de la *Joint Commission*” y el “modelo EFQM”.

Si exceptuamos este último, que podríamos considerarlo como una forma de diagnóstico organizacional, en realidad podría hablarse de un modelo industrial genérico, representado por la certificación ISO, y un modelo específico

de servicios de salud, con el modelo de la JCAHO (*Joint Commission on Accreditation of Health Care Organizations*) como ejemplo paradigmático. Sin embargo, los modelos ISO y el de la JCAHO ni se contradicen ni resultan incompatibles, por el contrario, pueden ser complementarios porque evalúan cosas en cierto modo diferentes

MODELOS ISO

La ISO (*International Organization for Standardization*) es un organismo internacional de normalización, cuyo objetivo es facilitar la coordinación y unificación internacional de las normas. En España está representada por AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación).

Los trabajos técnicos de las ISO son las Normas internacionales (normas ISO): en Europa, 16 países forman el CEN (Centro Europeo de Normalización) que producen las Normas Europeas (En, *European Norm*) traduciendo o adaptando las normas ISO, y en España se convierten en normas UNE (Una Norma Española). En el formato terminológico empleado para las normas, después de las siglas (UNE, EN, ISO) viene el número asignado a la norma y al año de publicación (ambos números se separan por dos puntos), y el nombre de la norma. Así por ejemplo la norma “UNE-EN ISO 9001:2000. Sistema de gestión de la calidad. Requisitos”. Es un título que nos indica que es una norma española (UNE), europea (EN), internacional (ISO), cuyo número identificativo es el 9001, y que fue publicada en el año 2000

La normalización es una actividad desarrollada por los Comités Técnicos de Normalización (donde están representados los agentes implicados), encaminada a establecer soluciones a situaciones repetitivas. El resultado de esta actividad son las Normas.

Las Normas son documentos técnicos en los que se especifican las pautas a seguir. Sólo unas pocas tienen que ver con los servicios de salud

Estas normas se utilizan como patrones para la certificación. Las que tratan del sistema de gestión de la calidad son a las que se suele hacer referencia al hablar del modelo ISO.

DOCUMENTOS ISO RELACIONADOS CON EL SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD	
UNE-EN ISO 9000 : 2005.	Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario.
UNE-EN ISO 9001 : 2008.	Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos.
UNE-EN ISO 9004 : 2000.	Sistemas de gestión de la calidad. Directrices para la mejora del desempeño.
UNE-EN ISO 19011: 2002.	Directrices para la auditoria de sistemas de gestión de la calidad y/o ambiental.
UNE 66925:2002 IN.	Directrices para la documentación de sistemas de gestión de la calidad. • UNE 66915 : 2001. Gestión de la calidad. Directrices para la formación.
UNE 66914 : 2000 .	Guía para la gestión de los efectos económicos de la calidad.
UNE 66908 : 1998.	Guía para la redacción de un manual de calidad
UNE 66904-5 : 1996.	Gestión de la calidad. Directrices para los planes de calidad.
I WA 1 : 2001..	<i>Quality management systems. Guidelines for process improvements in health services organizations</i>
ISO/TR 10013 : 2001.	<i>Guidelines for quality management system documentation.</i>
ISO 10015 : 1999.	<i>Quality Management. Guidelines for training</i>

Tabla 1. Documentos ISO relacionados con el sistema de gestión de la calidad. Adaptado de: Saturno PJ. Acreditación de instituciones sanitarias. Modelos, enfoques y utilidad. 2015.

Las Normas ISO para la certificación de los sistemas de gestión de la calidad son generales y necesitan ser interpretadas y adaptadas para el caso de instituciones sanitarias

Las normas ISO 9000 son las que se relacionan más directamente con el sistema de calidad de una organización. De ellas, la que se puede emplear como referencia para la certificación es actualmente la 9001: 2015 (Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos). En esta norma se especifican los requisitos del sistema de calidad

Los principios básicos tomados como directrices para la gestión de la calidad de las normas 9000 son:

- **Principio 1: Organización orientada al cliente.** Las organizaciones dependen de sus clientes y por lo tanto deberían comprender las necesidades actuales y futuras de los mismos, satisfacer sus requisitos y esforzarse en sobrepasar sus expectativas.
- **Principio 2: Liderazgo.** Los líderes unifican la finalidad y la dirección de la organización. Ellos deberían crear y mantener un ambiente interno, en el cual el personal pueda llegar a involucrarse totalmente en la consecución de los objetivos de la organización.
- **Principio 3: Participación del personal.** El personal, con independencia del nivel de la organización en el que se encuentre, es la esencia de una organización y su total implicación posibilita que sus capacidades sean usadas en beneficio de la organización.
- **Principio 4: Enfoque a procesos.** Los resultados deseados se alcanzan más eficientemente cuando los recursos y las actividades relacionadas se gestionan como un proceso.
- **Principio 5: Enfoque del sistema hacia la gestión.** Identificar, entender y gestionar los procesos interrelacionados como un sistema contribuye a la eficacia y eficiencia de una organización a la hora de alcanzar sus objetivos.
- **Principio 6: Mejora continua.** La mejora continua en el desempeño global de la organización debería ser un objetivo permanente de la organización.
- **Principio 7: Enfoque objetivo hacia la toma de decisiones.** Las decisiones efectivas se basan en el análisis de datos y en la formación.
- **Principio 8: Relación mutuamente beneficiosa con el suministrador** Una organización y sus suministradores son interdependientes, y unas relaciones mutuamente beneficiosas aumentan la capacidad de ambos para crear valor.

Estos criterios fueron empleados para la realización de la norma ISO 9001:2008, si bien en su revisión en 2015 se modificaron algunos aspectos, tal y como se muestra en la figura 1. Se describen los principales cambios:

- **Cambio en el principio 1:** El principal cambio en este principio es con respecto a la inclusión de las partes interesadas, mientras que anteriormente se hacía referencia únicamente al cliente.
- **Cambio en el principio 3:** En este principio se hace énfasis en la creación de valor, la consecución de los objetivos de la Organización, y el empoderamiento y mejora de habilidades y conocimientos de los individuos. Se refuerza a los individuos y su relevancia en la Organización
- **Cambio en el principio 5:** En este principio se elimina el concepto de "Mejora continua" y se hace referencia a un enfoque continuo en la mejora, lo



Figura 6. Estándares de las normas ISO 9001, en su versión de 2008 y de 2015. Tomado de <http://americantrustregister.blogspot.com/>

cual implica el análisis de riesgo y de oportunidades basado en el entorno y no únicamente en problemas internos.

- **Cambio en el principio 7:** En este principio se propone el cambio de, no sólo mirar hacia nuestros proveedores, si no a las partes interesadas de las cuales los proveedores son solo una parte. Así mismo se hace hincapié en uno de los enfoques que busca la norma que es el éxito sostenido.

La certificación del sistema de gestión de la calidad de acuerdo a las normas ISO se reconoce con la marca de “Empresa Registrada”

El listado de requisitos de la norma 9001 puede ser de utilidad para el diseño y remodelación de programas de calidad de instituciones sanitarias, si bien existen dos características problemáticas que son:

- Las normas ISO no son específicas para servicios de salud, y la adaptación puede ser difícil, ambigua, y por lo tanto discutible. Sin embargo, será tanto más fácil cuanto más tangible, automatizable y rutinario sea el servicio en las que se aplique, como son los casos de bancos de sangre, servicios de laboratorio, exámenes radiológicos, etc.
- Las normas ISO 9000 se refieren casi exclusivamente a aspectos formales y estructurales del sistema de gestión de la calidad. En ningún caso contemplan la calidad de los servicios en sí. El proceso de certificación del sistema de calidad, según la propia AENOR implica la evaluación y

control de las disposiciones de aseguramiento de la calidad propias de la empresa, pero no constituye una certificación de sus productos, procesos o servicios.

Como conclusión, podemos decir que las normas ISO 9000 son más aplicables cuanto más tangible y delimitado es el servicio considerado.

MODELO JCAHO

La JCAHO fue creada como JCAH (*Joint Commission on Accreditation of Hospitals*) en el año 1951 en base a un acuerdo entre el Colegio Americano de Cirujanos (*American College of Surgeons*), que tenía un programa de estándares voluntarios desde 1918, el Colegio Americano de Médicos (*American College of Physicians*), la Asociación Médica Americana (*American Medical Association, AMA*) y la Asociación Americana de Hospitales (*American Hospital Association, AHA*). El objetivo era establecer una forma de autorregulación voluntaria, y garantía de unas condiciones de trabajo adecuadas en los hospitales.

A lo largo de los años la JCAHO ha ido ampliando el tipo de instituciones que se acreditan, incorporando nuevos estándares sobre requisitos correspondientes a procesos y resultados, así como definiendo estándares óptimos en vez de mínimos.

Actualmente, los tipos de organizaciones que atienden a los estándares de la JCAHO son:

- Hospitales.
- Hospitales de “acceso crítico” (<25 camas)

- Atención ambulatoria / atención primaria.
- Cirugía ambulatoria (office-based surgery)
- Atención domiciliaria.
- Residencias de crónicos (long term care).
- Atención sanitaria a problemas de comportamiento (behavioral health care).
- Laboratorios.
- Redes de atención sanitaria

El catálogo de servicios se ha ampliado recientemente de forma muy considerable al incorporar un programa de certificaciones complementarias e independientes de la acreditación. La acreditación se mantiene enfocada a organizaciones, pero la certificación se aplica a enfermedades específicas (EPOC, Diabetes, ACV, Enfermedad Renal Crónica, etc.), servicios de contratación de personal temporal, centros de trasplante, y servicios o unidades clínicas para un determinado tipo de pacientes (Oncología, Salud de la Mujer, Rehabilitación Física, Psiquiatría Geriátrica, Cardiología, etc.). La gama es muy amplia y potencialmente ilimitada, puesto que, por ejemplo, en el documento sobre la certificación de la atención a enfermedades específicas se da un listado de 51, pero se indica que no es exhaustivo pudiéndose contemplar patologías adicionales

El modelo de acreditación específicamente sanitario se ha extendido a todo el mundo. La propia JCAHO ha creado una filial internacional para cubrir la demanda creciente de este tipo de programas en muchos países.

Los estándares de este modelo se agrupan en apartados, (Gestión de urgencias, Recursos Humanos, Control y Prevención de infecciones, Enfermería, Gestión de la Medicación, etc.). Mención especial tienen los aspectos relacionados con la seguridad del paciente, como por ejemplo la vigilancia de sucesos centinela y el apoyo metodológico para su análisis (*Root Cause Analysis*) que se incluye como obligatorio, así como los planes de acción consiguientes, en los estándares para obtener la acreditación.

Los posibles resultados de la valoración de los estándares, a través de un complicado sistema de puntuación, pueden ser los siguientes:

- **Acreditación con recomendación:** Organizaciones con unos resultados ejemplares.
- **Acreditación:** Organizaciones que cumplen en general con los estándares, aunque pueden necesitar mejorar en alguna área específica.
- **Acreditación con recomendaciones tipo I:** Existen deficiencias importantes (al menos una) y se precisa de una visita de seguimiento.
- **Acreditación provisional:** Cumplimiento suficiente de estándares. Se comprueba el estado de acreditación en una segunda visita.
- **Acreditación condicional:** Hay un incumplimiento substancial de los estándares, pero se considera

que puede cumplirlos al cabo de un determinado periodo de tiempo.

- **No acreditación preliminar:** Incumplimiento de estándares o retirada de estatus de acreditación por razones como falsificación de documentos, precisando una revisión.
- **No acreditación:** No cumple estándares o no solicita la acreditación.

Las dos grandes diferencias entre el modelo de JCAHO y el modelo ISO son su estándar específico para servicios de salud (Tabla 2) y su mayor nivel de detalle en los estándares que se definen. Sin embargo, en el modelo JCAHO no se detalla cómo tiene que ser el sistema de gestión de la calidad

ESTÁNDARES GENERALES DE LA JCAHO SOBRE GESTIÓN DE LA INFORMACIÓN EN UN HOSPITAL

El hospital mantiene historias clínicas completas y precisas (Incluye 13 elementos)
La información que se registra está debidamente refrendada (<i>authenticated</i>) (Incluye 5 elementos)
La información se registra a tiempo (Incluye 3 elementos)
El hospital audita sus historias clínicas (Incluye 3 elementos)
El hospital conserva sus historias clínicas (Incluye 2 elementos)
La historia clínica contiene información que refleja los servicios, cuidados y tratamientos que recibe el paciente. (Incluye 4 elementos)
La historia clínica documenta las intervenciones quirúrgicas u otros procedimientos de alto riesgo, y el uso de anestesia, incluyendo sedación moderada o profunda (Incluye 11 elementos)
La historia clínica documenta el uso de cualquier tipo de restricciones o inmovilización (Incluye 4 elementos)
La historia clínica contiene una lista-resumen para los pacientes que reciben atención ambulatoria (Incluye 4 elementos)
Las órdenes verbales se reciben y se anotan por parte del personal cualificado. (Incluye 4 elementos)
El hospital documenta la información del paciente al alta. (Incluye 1 elemento)

Tabla 2. Estándares generales de la JCAHO sobre gestión de la información en un hospital. Adaptado de: Saturno PJ: Acreditación de instituciones sanitarias. Modelos, enfoques y utilidad. 2015.

ACREDITACIONES ESPECÍFICAS EN OTROS PAISES DE HABLA ANGLOSAJONA

- **Canadá:**

El Consejo Canadiense de Acreditación de Instituciones Sanitarias (CCHFA) se creó a partir de una escisión de la JCAHO y en base a un acuerdo de asociaciones de profesionales.

Como en el caso de la JCAHO, la CCHFA ha ampliado el tipo de institución que acredita, ha pasado a contemplar estándares óptimos y establece un sistema de niveles de acreditación.

La CCHFA se diferencia de la JCAHO en su relación con el Gobierno, el mecanismo de establecimiento y revisión de estándares y la forma de valorar el cumplimiento de los estándares

- **Reino Unido:**

En el Reino Unido se ha expresado en varias ocasiones la necesidad de un programa de acreditación a nivel nacional, pero la realidad ha sido la atomización de iniciativas

Los dos programas más completos son:

- El Programa de Acreditación Hospitalaria que limita su ámbito de actuación a pequeños hospitales comunitarios.
- El Audit Organizacional de la King's Fund que es una fundación cuya misión es la mejora de la gestión en el Servicio Nacional de Salud Británico.

ACREDITACIONES EN INSTITUCIONES SANITARIAS ESPAÑOLAS

En España se puede señalar como antecedente de programas de acreditación, el establecimiento de criterios que los centros privados tienen que cumplir para poder establecer conciertos con el sistema público.

En Cataluña adoptaron la iniciativa del Ministerio de Sanidad como una Orden de Acreditación, revisada y ampliada en 1991.

Aunque no se ha establecido una política oficial en relación a la acreditación para todo el Sistema de Salud español, la autonomía de gestión, en función de las transferencias otorgadas a las Comunidades Autónomas, ha posibilitado el diseño e implementación de modelos propios de acreditación en los Sistemas de Salud de algunas de ellas, como es el caso del modelo andaluz (oficial a partir de 2003) y el catalán (oficial a partir de 2005). Ambos con matices propios y diferenciadores, en relación a las peculiaridades de los dos sistemas de salud, aunque con una base pública común.

El programa de acreditación de las instituciones sanitarias para la docencia de postgrado, desde su revisión a finales de los 80, se basa en la comprobación "in situ" de criterios explícitos, creados con la participación del Consejo Nacional de Especialidades, y podría ser considerado el germen de un programa de acreditación de todo tipo de instituciones sanitarias.

Cumplimiento de estándares del:	Niveles de acreditación en el modelo andaluz según cumplimiento de estándares		
	Avanzada	Óptima	Excelente
Grupo I	↑70% incluyendo todos los obligatorios	100%	100%
Grupo II		↑40%	100%
Grupo III			↑40%

Tabla 3. Estándares generales de la JCAHO sobre gestión de la información en un hospital. Adaptado de: Resolución de 24 de julio de 2002 por la que se establece el sistema de acreditación de la calidad en los centros y unidades sanitarias del sistema sanitario público de Andalucía. Saturno PJ: Acreditación de instituciones sanitarias. Modelos, enfoques y utilidad. 2015.

Por último, la Fundación Avedis Donabedian de Barcelona ha traducido y está aplicando los estándares originales de los JCAHO, en una iniciativa conjunta con esta institución.

ACREDITACIONES EN INSTITUCIONES SANITARIAS EN AMERICA LATINA

En 1990 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Federación Latinoamericana de Hospitales firmaron un convenio para desarrollar un "Manual de Estándares de Acreditación en América Latina", que fue presentado a los 22 países de la Región en 1991 y discutido en reuniones nacionales sub-regionales y conferencias latinoamericanas.

El Manual de Acreditación de la OPS ha sido adaptado en la práctica por unos pocos países; en otros se ha adaptado el esquema de la JCAHO y también se ha experimentado con el modelo ISO:

En el caso de México; La ISQua (Sociedad Internacional de Calidad en Servicios de Salud) ha desarrollado el programa ALPHA (*Agenda for Leadership in Programmes for Health Care Accreditation*) para armonizar y estandarizar diversos aspectos en torno a la acreditación específicamente sanitaria

AUTOEVALUACIÓN DE LAS ORGANIZACIONES: LOS MODELOS DEL MALCOM BALDRIGE AWARD Y DE LA FUNDACIÓN EUROPEA PARA LA GESTIÓN DE LA CALIDAD.

La autoevaluación organizacional surge con motivo de la

ESQUEMA DE EVALUACION DEL MODELO EUROPEO PARA LA GESTION DE CALIDAD TOTAL

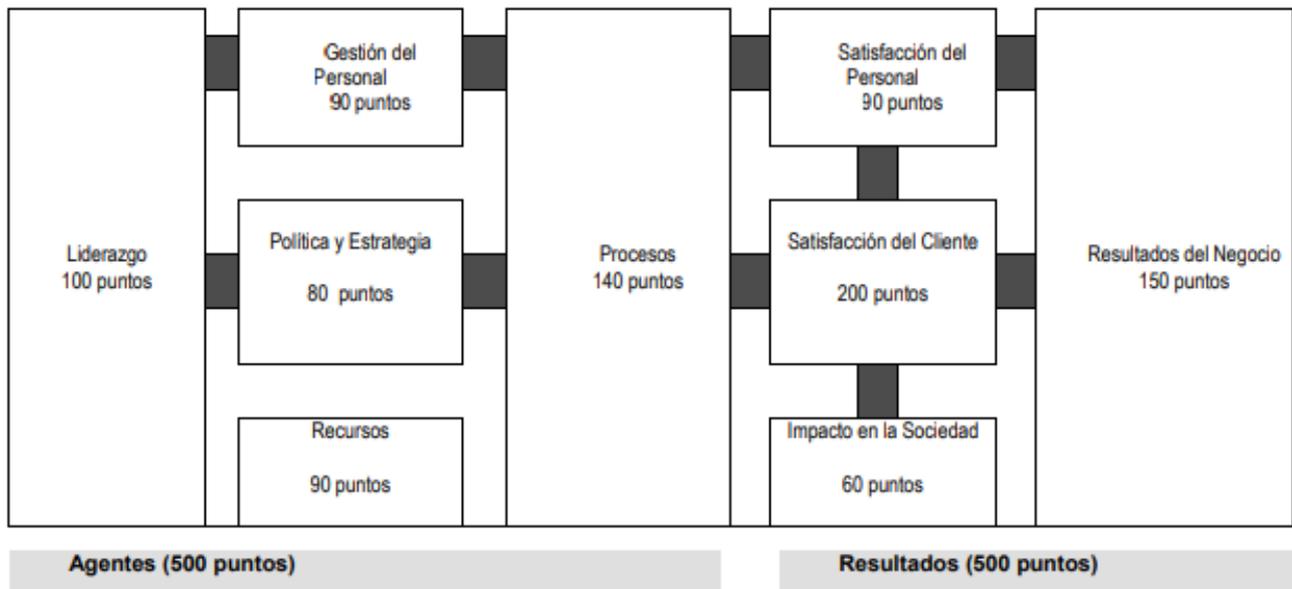


Figura 7 Esquema de evaluación del modelo EFQM. Tomado de: Saturno PJ. Acreditación de instituciones sanitarias. Modelos, enfoques y utilidad. 2015.

convocatoria de premios a la excelencia empresarial y se basa en la puntuación de una serie de apartados que cubren todos los aspectos del diagnóstico organizacional de interés para la gestión de la calidad total.

El más conocido a nivel europeo es la Fundación Europea para la Calidad (*European Foundation For Quality Management*, EFQM). Este modelo distingue nueve apartados que agrupa como criterios agentes y resultados.

Actualmente se propone utilizar los modelos de autoevaluación como mecanismos de identificación de los puntos débiles de la organización, con independencia de concurrir o no a los premios que impulsaron estos modelos.

El proceso de autoevaluación organizacional puede realizarse con diversos métodos, pero es siempre inútil si no es impulsado por la dirección de las organizaciones.

CONFLICTOS A LA HORA DE PONER EN PRÁCTICA LA ACREDITACIÓN

Aparte de la necesidad de considerar la acreditación como una actividad de monitorización, para que contribuya a la mejora de la calidad, hay otra serie de aspectos sujetos a discusión:

- **Conflicto entre la esencia de los estándares y la acreditación como un mecanismo de inspección externa:** La acreditación como mecanismo de inspección externa puede entrar en conflicto con la filosofía de la gestión total de la calidad y la mejora continua, que se basan en iniciativas internas.
- **Nivel de transparencia y utilización de los resultados del proceso acreditador:** Los resultados del proceso de acreditación se consideraron tradicionalmente confidenciales, pero ha ido en aumento el interés de la Administración y la población en que sean públicos.

- **Entidad acreditadora, ¿pública o privada?:** Se considera esencial que la entidad acreditadora sea privada e independiente, sin embargo, hay ejemplos de programas de acreditación ligados a la Administración, la misma JCAHO puede considerarse en la actualidad una colaboradora directa de la Administración. También hay quien cuestiona que los intereses profesionales puedan considerarse independientes.
- **¿Iniciativa central o descentralizada?:** Los sistemas diseñados por la autoridad central podrían ser vistos como interferencias a nivel local, y sistemas promovidos por la periferia raramente se generalizan más allá del ámbito local. Sin embargo, la necesidad lógica de generalización está explícitamente justificada. Debido al carácter igualitario con el que está concebido el sistema de salud, no serían asimilables niveles de exigencia o características para la acreditación que fueran diferentes en las diferentes provincias
- **¿Estándares mínimos u óptimos?** Parece que los estándares mínimos podrían asimilarse más a la filosofía de licencia u homologación, mientras que las acreditaciones vistas como mecanismos de distinción (tal como propugna el modelo ISO) deberían tender a estándares óptimos, y, más aún, cambiantes y continuamente mejorables
- **¿Cuál es el papel que se le otorga a la acreditación?:** El papel que se le otorga a la acreditación y lo que se espera de ella es diferente según sus diversos clientes potenciales.

CONCLUSIÓN

A lo largo del capítulo hemos visto diferentes modelos de acreditación, cada uno con sus ventajas y desventajas, aplicados a diferentes sectores o diferentes países.

Tras la lectura del mismo, se espera que el lector haya adquirido una visión más amplia de lo que implica un sistema de calidad para una institución y la diversidad de modelos que existen.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. AENOR: Normalización y Certificación. Conceptos básicos. 2ª ed. Madrid: AENOR; 1993.
2. European Foundation for Quality Management: Autoevaluación. Directrices para el sector Público: Salud. Bruselas: EFQM; 1995.
3. Norma UNE-EN ISO 9000-2000: Sistemas gestión de la calidad Fundamentos y vocabulario. Madrid: AENOR; 2000.
4. Norma UNE-EN ISO 9001:2000. Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos. Madrid: AENOR; 2000.
5. Saturno PJ. Acreditación de instituciones sanitarias. Modelos, enfoques y utilidad. Manual del Máster en gestión de la calidad en los servicios de salud. Módulo 8: Programas externos. Unidad temática 40. 2ª ed. Murcia: Universidad; 2008.
6. Saturno PJ. Diagnóstico organizacional. Importancia en la Implantación y Funcionamiento de los Programas de Gestión de la Calidad. Manual del Máster en gestión de la calidad en los servicios de salud. Módulo 1: Conceptos básicos. Unidad temática 8. Murcia: Universidad; 2008.
7. Saturno PJ. Programas internos y externos. Niveles y responsabilidades en la gestión de la calidad de los sistemas de salud. Manual del Máster en Gestión de la Calidad en los Servicios de Salud. Módulo 2: Implantación de programas de gestión de la calidad en los servicios de salud. Unidad Temática 7. 2ª ed. Murcia: Universidad; 2008.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- The Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations. The Joint Commission [internet]. Oakbrook Terrace, IL: JCAHO; 2022. Disponible en: <http://www.jcaho.org/>
- Entidad Nacional de Acreditación. Entidad Nacional de Acreditacion [internet]. Madrid: ENAC; 2022. Disponible en: <https://enac.es>

DELTA CHECK: MONITORIZACIÓN DE RESULTADOS

Autores: Jon Sánchez Munárriz; Cecilia Cueto-Felgueroso Ojeda

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

Palabras clave: *Delta check*; Valor de Referencia de Cambio; Variabilidad Biológica

INTERVALOS DE REFERENCIA: LIMITACIONES

Los intervalos de referencia poblacionales suponen, en la actualidad, la herramienta más frecuentemente utilizada para la interpretación de los resultados de laboratorio. Un intervalo de referencia se define como una distribución de valores comprendidos entre unos límites de referencia, obtenidos a partir de una población seleccionada que cumple unos criterios definidos: estado de salud, edad, sexo y otras condiciones relevantes.

Por convención, y por recomendación de la IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*), los límites del intervalo de referencia poblacional incluyen al 95% de la población. No obstante, la mayoría de los profesionales hacen uso de los valores de referencia sin ser conscientes de sus muchas limitaciones. La primera de ellas, y quizás la más importante, es la decisión de qué valores de referencia se van a establecer para las diferentes magnitudes biológicas. Para ello existe un modelo jerárquico con distintos niveles de evidencia.

NIVEL 1	Valores de decisión clínica
NIVEL 2	Valores de referencia obtenidos de una muestra de la población atendida por el laboratorio (n=120 individuos sanos)
NIVEL 3	Valores de referencia multicéntricos
NIVEL 4	Transferencia de un intervalo de referencia
NIVEL 5	Adopción de un intervalo de referencia con validación objetiva
NIVEL 6	Adopción de un intervalo de referencia con validación subjetiva
NIVEL 7	Adopción de un intervalo de referencia sin verificación
INDIRECTO	Valores de referencia mediante análisis de datos retrospectivo

Tabla 1. Modelo jerárquico de los valores de referencia. Adaptado de: Sikaris K, 2012.

Idealmente, a la hora de establecer los valores de referencia, cada laboratorio debe seleccionar, a partir de su población de estudio (ostensiblemente sana), una muestra representativa de individuos, a los que se les determinan los parámetros de interés. Tras un estudio, se obtiene una distribución de referencia donde se delimitan los percentiles al 2.5% y 97.5% (parámetro ajustable a dos colas) o el 95% (una cola), previa eliminación de valores atípicos (*outliers*). Esto se traduce en que siempre existe un 5% de pacientes por encima o por debajo del intervalo de referencia. Se trata de pacientes no enfermos (falsos positivos), que simplemente presentan valores diferentes a la mayoría de la

población de referencia. En general, es habitual obtener distribuciones de tipo Gauss, pero hay parámetros cuyo comportamiento es diferente (Poisson), etc.

La IFCC recomienda emplear el término intervalo de referencia en lugar de rango de referencia, puesto que, de un modo estricto, un rango implica la diferencia entre dos números. Del mismo modo, el término “valor de referencia” hace referencia al dato obtenido del individuo de referencia, mientras que el término “límite de referencia” se refiere a los dos valores de corte que contienen el 95% de los valores de referencia. Este matiz resulta importante puesto que para ciertos parámetros vamos a encontrar individuos cuyos valores de referencia disten mucho de los límites de referencia poblacionales. En la práctica clínica habitual se deben utilizar los términos intervalo y límite de referencia.

• Variabilidad biológica

La variabilidad biológica total se define como la variabilidad de resultados que podemos obtener cuyo origen o causa inherente es el individuo. Distinguimos entre a) Variabilidad biológica intraindividual, que corresponde a las fluctuaciones alrededor del punto de ajuste homeostático propio de un individuo (variabilidad de resultados que podemos encontrar en un mismo individuo); y b) Variabilidad biológica interindividual, que define la variación entre los diferentes puntos de ajuste homeostáticos de los individuos de una población (variabilidad de resultados que podemos encontrar dentro de una población determinada). El índice de individualidad se calcula como el ratio entre el coeficiente de variación intraindividual y el coeficiente de variación interindividual.

Si controlamos la variación preanalítica y cuantificamos la variación analítica podremos estimar por descarte la variación biológica intra e interindividual. Esto se lleva a cabo de la forma similar a cómo se ha comentado con los límites de referencia poblacionales, pero en este caso, en lugar de medir muchos individuos una vez, se estudia un menor número de individuos (estudio de cohortes) varias veces (días, semanas, meses).

Como es lógico pensar, la influencia de la individualidad en los valores de referencia representa un importante problema. Esto es sencillo de comprender mediante dos ejemplos.

- El parámetro analítico hierro presenta muy baja variabilidad interindividual, es decir, escasa individualidad (índice de individualidad de 1.14). En estos casos, los límites de referencia que delimitan el 95% de la población sana son próximos a los valores de referencia de cada individuo, de modo que, pequeños desplazamientos en los valores del hierro tendrán una probabilidad mucho mayor de caer fuera del intervalo de referencia convencional,

siendo detectado analíticamente y permitiendo tratar al paciente. En este supuesto, los intervalos de referencia son siempre útiles.

- En el caso contrario, en el que se encuentran la gran mayoría de parámetros estudiados en bioquímica y hematología, encontramos por ejemplo a la creatinina, que presenta un índice de individualidad de 0,33, es decir, elevada individualidad, elevada variación interindividual y escasa variabilidad intraindividual. En estos casos, cambios inusuales en valores de creatinina, pueden pasar inadvertidos porque se encuentren dentro de los límites de referencia, lo cual pone de manifiesto la poca utilidad de los intervalos de referencia convencionales para estos parámetros. Los individuos pueden tener resultados de creatinina que sean inusuales para ellos, pero que aún se encuentren dentro del intervalo de referencia convencional.

En definitiva, los intervalos de referencia poblacionales generalmente no resultan de ayuda para conocer si se ha producido un cambio significativo en el paciente. Dado que la mayor parte de los resultados de laboratorio se utilizan para el seguimiento de pacientes y no para el diagnóstico, los valores de referencia poblacionales son, en general, poco apropiados como herramienta de monitorización. Si bien es posible incrementar el índice de individualidad mediante estratificación de los intervalos de referencia, las limitaciones persisten. En magnitudes biológicas con individualidad marcada es más conveniente la comparación con los valores previos, de ahí la importancia de llevar a cabo una implementación del *delta check* en los laboratorios.

DELTA CHECK

Descrito por primera vez en 1974 por Nosanchuk y Gottmann, el estadístico *delta check* se define como el cálculo, para un parámetro, de la diferencia entre un resultado actual y uno previo consecutivos, en términos absolutos o relativos, en un periodo de tiempo.

Se establecen unos valores de *delta check* límite predefinidos. Si la diferencia entre el valor actual y el previo excede dichos límites se generará una alerta *delta check*, independientemente de que el valor se encuentre dentro o fuera de los intervalos de referencia, que nos estará informando si el cambio observado en un paciente puede ser potencialmente patológico o si pudiera existir algún problema con la muestra. De este modo se consigue una monitorización del cambio significativo del paciente.

Las guías del CLSI EP33: "Use of Delta Check in the Medical Laboratory" describen en profundidad un flujo de procesos cuyo objetivo es armonizar y estandarizar este proceso de implementación de alertas *delta check* en los laboratorios. Los pasos a seguir incluyen: el conocimiento de la utilidad de este indicador, qué parámetros son más susceptibles de monitorizar mediante *delta check*, cuáles son las alternativas para su cálculo, cuál es su aplicabilidad en el Sistema Informático de Laboratorio (SIL), así como el plan de actuación ante las diferentes alarmas.

Las alertas *delta check* permiten detectar errores mediante la utilización de una aproximación de control de calidad fundamentada en el paciente. *Delta check* constituye, actualmente, la mejor forma que tenemos de detectar errores de especímenes: asociación de número de historia incorrecto (cruce de pacientes), identificación de muestras en mal estado (contaminación, hemólisis, lipemia, ictericia), problemas de estabilidad, centrifugación y un sinfín de errores originados en la fase preanalítica.

En lo relativo a la fase analítica, las alertas *delta check* informan de posibles errores analíticos, ya que un aumento de alertas generalizado para un mismo parámetro en un elevado número de pacientes nos advertiría de posibles problemas en su determinación. Además, en caso de disponer de varios analizadores idénticos permite demostrar la intercomparación de resultados.

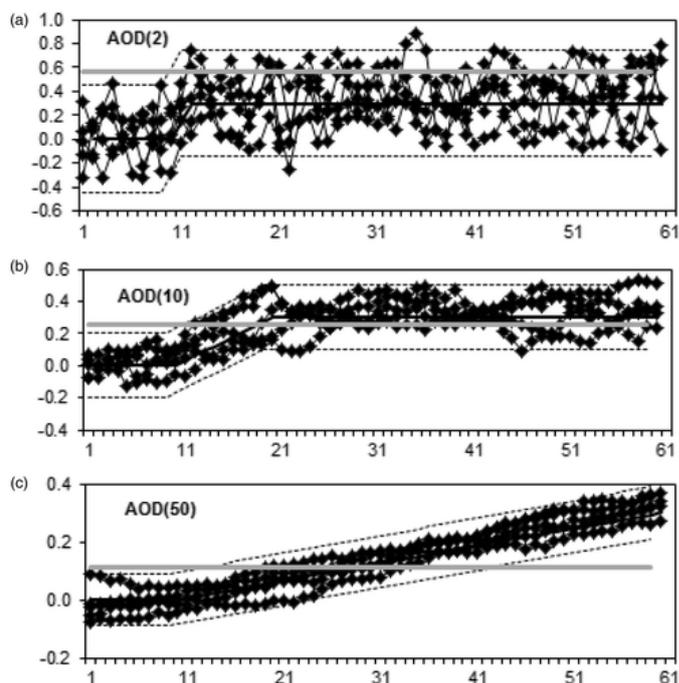


Figura 1. Ejemplo de error sistemático constante y proporcional en un sistema analítico. Adaptado de: Jones G, 2016.

Delta check presenta gran utilidad en la monitorización del cambio clínico significativo, es decir, determinar si el cambio entre el valor previo y el valor actual es lo suficientemente elevado para no ser fruto del azar. Esto tiene especial relevancia en situaciones clínicas diversas como el estudio de la hiponatremia, el fracaso renal agudo, la velocidad de variación del PSA (antígeno prostático específico), y por supuesto, la tasa de elevación de la troponina cardiaca en el evento coronario agudo.

Finalmente, la alerta *delta check* permite a los laboratorios clínicos diseñar protocolos de autovalidación de resultados, de especial utilidad en hospitales con elevada carga asistencial.

No obstante, y como principal limitación, dado que la utilización del *delta check* implica la necesidad de comparar con un resultado previo, el empleo de intervalos de referencia continúa siendo necesario para el diagnóstico y cribado de patologías. Por este motivo, la prueba ideal de laboratorio ha

de tener una variación biológica intraindividual e interindividual mínimas, permitiendo un diagnóstico y seguimiento adecuado mediante el uso de intervalos de referencia o *delta check*, respectivamente.

La selección de parámetros potencialmente monitorizables mediante alerta *delta check* atiende a cada parámetro en concreto y se realiza en función del objetivo que hayamos propuesto cumplir: por ejemplo, si deseamos llevar a cabo una detección de errores de muestra, interesará estudiar parámetros como glucosa, sodio, potasio, LDH, MCV, etc.

El valor del *delta check* se puede obtener mediante diferentes aproximaciones como Valor de Referencia de Cambio (VRC) o *delta check* derivado de bases de datos de pacientes, que se exponen a continuación. Es importante valorar todas las opciones disponibles en función del parámetro estudiado y la finalidad de uso deseada.

VALOR DE REFERENCIA DE CAMBIO (VRC)

El valor de referencia de cambio (VRC) constituye la herramienta más adecuada para evaluar el cambio entre resultados seriados de una magnitud biológica determinada. Su cálculo es sencillo y se lleva a cabo a partir del coeficiente de variación analítico (CV_A), el coeficiente de variación intraindividual (CV_I) y el Z-score estadístico mediante la siguiente fórmula:

$$VRC = 2^{1/2} \times Z (CVA^2 + CVI^2)^{1/2}$$

Esta fórmula nace de la premisa de que la diferencia entre dos resultados consecutivos será considerada significativa siempre que sea mayor que la combinación de la variación total inherente de ambos resultados.

La variación total de cada resultado es una combinación de la variación preanalítica, analítica, postanalítica e intraindividual, de manera que: $S_{Total}^2 = S_{Pre}^2 + S_{Post}^2 + S_A^2 + S_I^2$ (suma de varianzas).

Son fuentes de variabilidad preanalítica, atribuibles al conjunto de procesos que se realizan desde que se recibe la petición analítica hasta que se inicia la fase analítica: los ritmos circadianos (ej. cortisol, hormona del crecimiento), el ayuno, el ejercicio, la toma de medicamentos, la altitud, la postura, el tipo de muestra, anticoagulante, el tiempo de aplicación del torniquete, el tiempo y condiciones de transporte, la centrifugación, el almacenamiento (fotosensibilidad, temperatura), etc.

En cuanto a la variabilidad analítica, debida a fluctuaciones asociadas directamente con el conjunto de procesos relacionados con la medición, cabe destacar: la aparición de errores debidos al procedimiento de medida, por problemas en el instrumento de medida (ej. temperatura de incubación anómala), superficies ópticas contaminadas, diluciones mal realizadas, etc.

Existen dos tipos de errores analíticos. Error aleatorio (imprecisión) y el error sistemático (inexactitud).

El error analítico aleatorio (imprecisión) se define como la dispersión entre resultados independientes de mediciones obtenidas por un procedimiento de medida bajo condiciones especificadas. Es inherente al sistema analítico y a la

metodología empleada, dependiendo de fluctuaciones en la temperatura, variación en los volúmenes de muestra y/o reactivo dispensado por la pipeta, cambios en el entorno y manejo inconsciente de los materiales. Interesa disponer de un método con buena precisión para que su variación analítica aleatoria, que es inevitable, no sea elevada. En cambio, el error sistemático, definido por la ISO como la diferencia de concordancia entre el resultado de una medición y el valor verdadero del mesurando (veracidad) es predecible y podemos corregirlo si es de tipo constante.

La variabilidad postanalítica, en la actualidad, es mínima, gracias a la informatización y conectividad informática. Esta se debe a errores acontecidos durante la fase postanalítica, que abarca los procesos posteriores a la obtención del resultado analítico: fallos en la transcripción de datos, valores de referencia mal definidos, etc.

Por último, la variabilidad biológica, de tipo interindividual o intraindividual, es inherente al individuo y se debe a cambios relacionados con la edad, los ritmos circadianos, ciclos menstruales, ritmos estacionales, etc.

En conjunto, y dado que las variaciones preanalíticas y postanalíticas suelen ser relativamente bajas, negligibles, se simplifica la fórmula a: $S_{Total}^2 = S_A^2 + S_I^2$. Además, dado que las medias son similares para ambos resultados, es posible trabajar en su lugar con coeficientes de variación: $CV_{Total} = (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$. Suponiendo que los parámetros siguen una distribución normal (Z), y teniendo en cuenta que estamos considerando la variación de dos resultados (2x), obtenemos la fórmula de Harris simplificada para el cálculo del valor de referencia de cambio: $VRC = 2^{1/2} \times Z (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$.

Si trabajamos con parámetros donde los cambios pueden ocurrir en ambas direcciones utilizaremos los Z-scores para distribuciones con dos colas (1.96 para 95% significativo y 2.58 para 99% altamente significativo). Si los cambios sólo pueden ir en una dirección, utilizaremos entonces los Z-scores unidireccionales (1.65 para 95% y 2.33 para 99%). Ahora bien, es importante destacar que la probabilidad de decisión clínica no siempre correlaciona con la probabilidad estadística definida al 95% o al 99%. No deberíamos asumir que un cambio entre resultados no estadísticamente significativo carece de relevancia clínica. Por otro lado, un cambio entre resultados puede ser, desde el punto de vista estadístico, altamente significativo, pero no merecer ninguna acción clínica.

En lo que concierne al coeficiente de variación analítica, éste se debe obtener de nuestro propio laboratorio, a partir de la imprecisión obtenida con el control de calidad interno de cada parámetro. El coeficiente de variación intraindividual se puede calcular mediante estudios poblacionales o, lo que es más habitual, obtenerlos a partir de bases de datos de variación biológica fidedignas.

En general, las estimaciones de variabilidad biológica intraindividual, procedentes de la literatura científica, son constantes, independientemente del número de sujetos, la edad, la escala de tiempo del estudio, la metodología y el país en que se realizaron los estudios.

Absolute delta (AD Δ) check

$$AD\Delta = \text{Current test value} - \text{Previous test value}$$

Percentage delta (PD Δ) check

$$PD\Delta = \frac{\text{Highest value of Previous and Current} - \text{Lowest value of Previous and Current}}{\text{Lowest of Previous and Current}} \times 100\%$$

or

$$PD\Delta = \frac{\text{Current test value} - \text{Previous test value}}{\text{Previous test value}} \times 100\%$$

Absolute rate-difference delta (AR Δ) check [37]

$$AR\Delta = \frac{\text{Current test value} - \text{Previous test value}}{\text{time interval between sample}}$$

Percentage rate-difference delta (PR Δ) check [37]

$$PR\Delta = \left[\frac{\text{Current test value} - \text{Previous test value}}{\text{Previous test value}} / \text{Time} \right] \times 100\%$$

Figura 2. Cálculo de “delta-valores” mediante diferentes aproximaciones. Adaptado de: CLSI EP33, 2016.

En los individuos enfermos, si la magnitud biológica no se ve alterada por la enfermedad, la variabilidad biológica es del mismo orden que en individuos sanos. Incluso si la magnitud biológica se ve afectada por la enfermedad, si esta es crónica y el estadio de la enfermedad es estable, hay evidencias de que la variabilidad biológica intraindividual es de la misma magnitud que en individuos sanos. En consecuencia, las bases de datos existentes sobre variabilidad biológica pueden usarse en todos los laboratorios.

Existen publicaciones con grandes bases de datos sobre los componentes de la variabilidad biológica, y son de fácil acceso. Es completamente correcto utilizar estas bases de datos en la práctica diaria. No obstante, es preciso utilizar publicaciones de calidad. En este sentido, en 2016 surgió el proyecto BIVAC ([The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist](#)), que realiza una evaluación de las publicaciones acerca de variabilidad biológica, asignando un score. La EFLM (*European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory*) estableció en 2016 la *TFG-BVD: Biological Variation Database*, con la finalidad de emplear estimadores robustos, obtenidos a partir de estudios con tratamiento estadístico de datos de calidad, homocedasticidad, normalidad, estudio de *outliers*, etc. Una vez valoradas las diferentes publicaciones, BIVAC, mediante un metaanálisis, otorga un resultado global de variabilidad biológica individual consenso.

Las limitaciones en la utilización del valor de referencia del cambio son las derivadas de la simplificación matemática

realizada en la fórmula de Harris, puesto que hay parámetros que no se comportan siguiendo una distribución gaussiana.

Además, este modelo asume que no existe correlación entre resultados sucesivos. El supuesto anterior parece razonable cuando las determinaciones entre muestras se realizan a medio o largo plazo. Sin embargo, cuando los análisis se realizan diariamente o varias veces en un mismo día, situación que sucede en pacientes ingresados, y especialmente en enfermos agudos, es probable (y hay evidencias cuantitativas para apoyar esta hipótesis) que exista una correlación entre las series.

Por otro lado, se asume que el coeficiente de variación analítico utilizado en la fórmula para el valor de referencia de cambio es constante, lo cual, puede no suceder en la realidad, sobre todo si se producen con frecuencia cambios significativos en el error sistemático debido a recalibraciones.

Estas limitaciones se ven superadas mediante la utilización de fórmulas matemáticas más complejas: VRC Fokkema (transformación log-normal; no normalidad), Jones GR (no homocedasticidad), Queraltó JM (resultados correlacionados), etc.

Las guías CLSI EP33 no proporcionan una recomendación específica respecto al intervalo de tiempo específico en el que es posible aplicar las alertas *delta check*. Normalmente se activan si la diferencia es menor de una semana, pero no es extraño encontrar intervalos de tiempo superiores a una semana. Cada laboratorio debe determinar estos intervalos e ir ajustando en función de la experiencia y finalidad de uso.

Harris simplificado	$VRC = 2^{1/2} \times Z (CVA^2 + CVI^2)^{1/2}$
Resultados correlacionados (Queraltó JM)	$VRC = Z * 2^{1/2} ((CVt^2 * (1-r))^{1/2})$
No Homocedasticidad (Jones GR)	$VRC = 100 * (-b +/- (b^2 - 4*a*c)^{1/2}) / (2*a)$
Transformación Log-normal (Fokkema)	$VRC = \exp(+/-Z * 2^{1/2} * [DSt]) - 1) * 100$

Tabla 2. Modelos para el cálculo del Valor de Referencia de Cambio (VRC) (Adaptado de Zaragoza JM y Castellví JB, 2020)

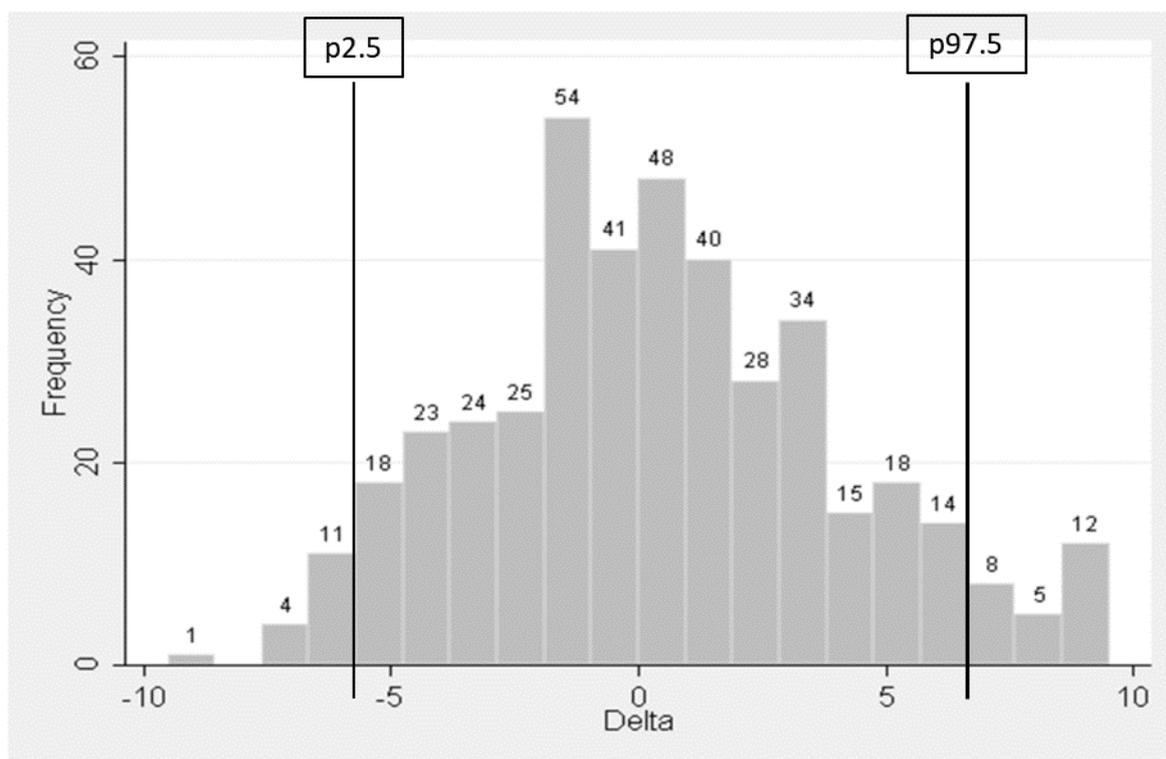


Figura 3. Definición de límite delta check. Histograma de frecuencias. Adaptado de: CLSI EP33, 2016.

DELTA CHECK CALCULADO EN BASES DE DATOS

Este método conlleva la búsqueda en pacientes de un gran número de pares de resultados consecutivos que sean similares a los datos del paciente en quien aplicaremos los valores *delta check*. Se calculan los “*delta-valores*”, definidos en términos de diferencia absoluta, diferencia relativa, velocidad de la diferencia, etc., en función del parámetro de interés.

Posteriormente, se representan los “*delta-valores*” en un histograma de distribución de frecuencias; y se delimitan los valores *delta-check* que se utilizarán (percentiles 95 o 99) con una o dos colas, dependiendo del parámetro estudiado. La determinación del *delta check* mediante estudios retrospectivos presenta la ventaja de que cada laboratorio establece sus límites basándose en su población y sistemas analíticos.

DELTA CHECK: OTRAS APROXIMACIONES

- **Valor empírico**

Los valores de *delta check* se establecen teniendo en cuenta criterios y opinión de expertos clínicos. Están basados en la experiencia, o en la obtención a partir de publicaciones de otros laboratorios.

- **Parámetros cualitativos**

En el caso de magnitudes cualitativas obviamente no es necesario calcular límites de *delta check*, sino generar alertas *delta check* en caso de que un resultado positivo cambie a negativo o viceversa (por ejemplo: grupo ABO, estudios de autoinmunidad, test genéticos, moleculares, electroforesis, inmunofijación, etc.).

- **Delta Check Multivariante**

Se trata de combinar los límites delta check de varios parámetros relacionados (por ejemplo: creatinina y urea; AST y ALT; hemoglobina y hematocrito), mejorando la especificidad del *delta check*. Están basados en la correlación positiva (fallo renal agudo: incremento de urea y de creatinina), o en la correlación negativa (por ejemplo, hemorragia: disminución de hemoglobina y hematocrito). Estas aproximaciones son más útiles que las simples, pero a menudo son complejas y no implementables en la mayoría de los laboratorios.

CONSIDERACIONES FINALES

En definitiva, existe consenso en la implementación de alertas *delta check* en los informes de laboratorio del mismo modo que se emplean los valores de referencia poblacionales. Los resultados pueden cambiar desde dentro hacia fuera de los intervalos de referencia (y viceversa) sin que ello conlleve significación clínica

Independientemente del método que se utilice para obtenerlas, estas alertas deben revisarse para ver si son apropiadas. Cualquier comentario o reclamación de los servicios peticionarios respecto al número de resultados inusuales o un aumento de imprecisiones clínicas que no encajen con los resultados analíticos debe provocar una revisión seria y detallada de los valores establecidos en el laboratorio.

En cualquier caso, el laboratorio deberá disponer de un Sistema Informático de Laboratorio (SIL) capaz de llevar a cabo un algoritmo de evaluación con acceso a los resultados previo y actual de cada paciente (VRC, unidireccional, bidireccional, absoluto, relativo, tasa, etc.). Asimismo, las

alertas *delta check* deberán ser visibles en el informe de resultados y será necesario establecer un plan de acción para que los facultativos interpreten adecuadamente estas alertas en la práctica diaria.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Aarsand AK, Røraas T, Fernandez-Calle P, Ricos C, Díaz-Garzón J, Jonker N, et al. The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist: A Standard for Evaluating Studies on Biological Variation. *Clin Chem.* 2018;64(3):501-14.
- Carobene A, Aarsand AK, Bartlett WA, Coskun A, Díaz-Garzón J, Fernández-Calle P, et al. The European Biological Variation Study (EuBIVAS): a summary report. *Clin Chem Lab Med.* 2021 May 31;60(4):505-17.
- Doménech MV, Hernández A, Ricós C, Minchinela J, García-Lario JV, Perich C, et al. Variación biológica en patologías: revisión de datos y consecuencias clínicas. *Rev Lab Clin.* 2008;1(1):17-23.
- Jones GR. Average of delta: a new quality control tool for clinical laboratories. *Ann Clin Biochem.* 2016;53(1):133-40.
- Ricós C, Perich C, Doménech M, Fernández P, Biosca C, Minchinela J, et al. Variación biológica. Revisión desde una perspectiva práctica. *Rev Lab Clin.* 2010;3(4):192-200.
- Sikaris K. Application of the stockholm hierarchy to defining the quality of reference intervals and clinical decision limits. *Clin Biochem Rev.* 2012;33(4):141-8.
- Wayne, PA. CLSI. Use of Delta Checks in the Medical Laboratory. CLSI guideline EP33. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.

BLOQUE III

SESIONES DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

INESTABILIDAD DEL ADN: MUTACIONES DINÁMICAS

Autores: Jon Sánchez Munárriz; David Cuevas Gómez; Ana Arteché López

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

Palabras clave: ADN Repetitivo, Mutaciones Dinámicas, Expansión de Tripletes

GENOMA HUMANO Y VARIABILIDAD INTERINDIVIDUAL

El genoma humano nuclear tiene un tamaño aproximado de 3.200 Mb (o millones de bases) de las cuales alrededor de 2.950 Mb corresponden a eucromatina (poco condensada, transcripcionalmente activa) y unas 250 Mb a heterocromatina (con mayor grado de compactación y bajo nivel de expresión). Esta cifra se refiere al genoma haploide, por lo que el tamaño del genoma en las células somáticas diploides es aproximadamente el doble.

Aproximadamente, un 30% del genoma humano está compuesto por secuencias relacionadas con genes (exones, intrones y regiones reguladoras, entre otras). Se estima que el genoma humano contiene en torno a 23.000 genes y que sólo un 1,5-2% del total corresponde a regiones codificantes, exones cuyo tamaño medio aproximado es de 150 nucleótidos¹. Las regiones intrónicas abarcan un 24% del total y presentan gran variabilidad de tamaños. El 70% restante corresponde a ADN extragénico, regiones intergénicas no codificantes sin ningún elemento funcional, formado principalmente (>70%) por componentes repetitivos del genoma (ver más adelante).

Del total de ADN de nuestro genoma, un 95-98% corresponde a pseudogenes, intrones, secuencias UTR, y otros ADNs no codificantes. En humanos, se estima que existen más de 19.000 pseudogenes, secuencias semejantes a genes conocidos que han perdido su capacidad de codificar proteínas a causa de la acumulación de múltiples mutaciones. Se clasifican en:

- Pseudogenes duplicados o sin procesar: se originan por duplicación del gen original, contienen exones e intrones, pero carecen de promotor.
- Pseudogenes procesados o retrogenes: copias del ARN mensajero de un gen que se ha retrotranscrito e insertado en otra posición del genoma, carecen de intrones y de promotor. Ambos tipos suelen contener codones prematuros de parada.

Otro componente del genoma son los transposones, que consisten en elementos móviles que se pueden replicar e insertar en diferentes localizaciones del genoma. Existen 2 tipos de transposones dependiendo de si utilizan el ARN como intermediario para duplicarse o desplazarse (retrotransposones o clase 1, como los LTRs, LINEs, SINEs, ver más adelante) o no (DNA-transposones o clase 2). Asimismo, se han identificado más de 300 genes de micro/miniARN en el genoma humano, localizados la mayoría en intrones de genes codificantes. Se trata de regiones conservadas en primates².

El genoma humano presenta gran heterogeneidad en su secuencia, con regiones ricas en G+C flanqueadas por regiones pobres, siendo el contenido medio de G+C del 41%, menor de lo teóricamente esperado (50%). Además, a diferencia de otros genomas, cuenta con mayor cantidad de secuencias o regiones duplicadas, las cuales se clasifican según el tamaño en duplicaciones segmentarias (<1Kb con >90% homología y localizados frecuentemente en regiones centroméricas y/o teloméricas), intercromosómicas (10-50Kb) o intracromosómicas (~100Kb).

• Variabilidad genética interindividual

La secuenciación del genoma humano nos ha permitido conocer la gran variación genética interindividual, con más de 10 millones de polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms* [SNPs]) identificados entre diferentes poblaciones (proyectos *Human Genome Project* [HGP] y HapMap). Estos SNPs constituyen una de las secuencias más importantes de variabilidad genética entre individuos y explicaría, en muchos casos, las diferencias de susceptibilidad a enfermedades o en la respuesta a fármacos (farmacogenética).

Asimismo, existen diferencias en el número de copias de grandes segmentos genómicos (unas 200-300 regiones de entre 10 y 50 Kb) cuyo número de copias difiere de unos individuos a otros. Son las llamadas CNPs (*Copy Number Polymorphisms*) que suelen estar flanqueadas por duplicaciones segmentarias, lo que probablemente indica que son el resultado de reordenaciones entre esos elementos flanqueantes.

Finalmente, se ha catalogado también otro tipo de variación consistente en polimorfismos de pequeñas inserciones/deleciones, con un tamaño comprendido entre 1 nucleótido y 10 kb.

EL ADN REPETITIVO

Hasta un 50% del genoma humano está constituido por ADN repetitivo (antiguamente conocido como "ADN basura"), formado mayoritariamente por ADN no codificante. Destaca el ADN ribosomal, de aproximadamente 2 Mb de tamaño, localizado en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22).

En el ADN no codificante, tanto en regiones intragénicas como extragénicas, encontramos diversos tipos de elementos repetidos. Se tratan de secuencias de ADN que se repiten cientos o miles de veces y que puede aparecer en tándem con tamaños variables entre individuos (8% del genoma humano) o dispersas (45% del genoma humano).

- **ADN repetido en tándem**

- **ADN satélite**

Son secuencia de ADN en la que fragmentos grandes de ADN no codificante (desde 100 kb hasta varias Mb) se repiten en tándem. Constituye el principal componente estructural de la heterocromatina, estando la mayoría localizado en región telomérica o centromérica. Recibe este nombre porque al separar el ADN genómico en gradientes de densidad, aparece como 3 bandas "satélites" de la banda principal.

Un tipo de ADN satélite muy importante es el Satélite alfa, localizado en los centrómeros de los cromosomas, cuya secuencia repetida es de 171 nucleótidos. Otros ejemplos son el ADN Satélite 1 (secuencia repetida de 42 nucleótidos, n veces), el Satélite 2 (ATTCCATTCG) $_n$ y el Satélite 3 (ATTCC) $_n$ ³.

- **ADN Minisatélite**

Está formado por secuencias de 6 - 25 nucleótidos que se repiten en tándem. El número de repeticiones es variable, pero en general es menor de 100 (tamaño total entre 100 nucleótidos y 20 kb). Un ejemplo es la repetición de los telómeros de los cromosomas, en los que el hexanucleótido TTAGGG se repite miles de veces.

- **ADN Microsatélite**

Está formado por secuencias de menos de 6 nucleótidos repetidos en tándem. El número de repeticiones es variable entre individuos (tamaño total < 150 nucleótidos), motivo por el cual son marcadores genéticos frecuentemente utilizados en el análisis forense del ADN.

Ejemplos: repeticiones de dinucleótidos (CA, GC, etc), o de trinucleótidos (CAG, CGG, etc).

- **ADN repetido disperso**

- **Elementos SINE**

Los SINE (*Short Interspersed Nuclear Elements*, o, elementos nucleares dispersos cortos) suponen un 13% del genoma humano y corresponden a secuencias cortas repetidas miles de veces. El principal SINE es la familia de elementos Alu, el retrotransposón más frecuente (10% del genoma) con 250 nucleótidos y más de un millón copias por genoma. Recientemente se ha identificado su participación en el direccionamiento ribosomal de las proteínas⁴.

- **Elementos LINE**

Los LINE (*Long Interspersed Nuclear Elements*, o elementos nucleares dispersos largos) constituyen un 20% del genoma humano. Son secuencias con un tamaño de varias kilobases, agrupados en distintas familias. El principal LINE es el LINE-1 o L1 (15% del genoma), formado por una secuencia de unas 6 kb repetida unas 800,000 veces en el genoma. Los elementos LINE también son retrotransposones.

- **Secuencias LTR**

Repeticiones terminales largas que derivan de retrovirus humanos (HERV) que se han integrado en el genoma humano en el curso de la evolución. Con frecuencia son el origen de proto-oncogenes celulares. Constituyen alrededor de un 8% del genoma.

Tanto los LINE como los Alu completos pueden, en teoría, copiarse e insertarse aleatoriamente en otra posición del genoma. De ahí que su potencial patogénico se deba a esta capacidad de insertarse en el genoma e interrumpir genes, desregular la expresión de genes cercanos (por los elementos promotores de los LINE y SINE), o producir una recombinación entre copias de Alu o L1 que están en localizaciones cromosómicas distintas.

POTENCIAL PATOGENICO SECUENCIAS REPETIDAS

Existe un tipo de mutaciones más complejas que afecta a las secuencias repetidas dispersas (elementos Alu y LINE) y en tándem (minisatélites y microsatélites).

- **Mutaciones debidas a repeticiones dispersas**

Las repeticiones dispersas del genoma son más susceptibles de un sobrecruzamiento desigual, que consiste en un emparejamiento incorrecto e intercambio de ADN entre regiones de cromosomas homólogos o no homólogos, pero genéticamente similares.

Este fenómeno de recombinación desigual es causa frecuente de duplicaciones o deleciones cuando tienen lugar entre repeticiones no alélicas de gran tamaño con un alto grado de homología, como son las duplicaciones segmentarias (por ejemplo, Charcot-Marie-Tooth o Síndrome de Smith-Magenis). En caso de que elementos repetidos se recombinen en la orientación contraria, se originarán inversiones como ocurre frecuentemente en casos de hemofilia A o distrofia muscular de Emery-Dreifuss, entre otros.

- **Mutaciones debidas a repeticiones en tándem**

Un tipo de mutación que afecta con frecuencia a las repeticiones cortas en tándem de tipo microsatélite es la expansión o contracción de la repetición. Este fenómeno se produce habitualmente por un mecanismo de desemparejamiento por deslizamiento de cadenas, fenómeno que acontece durante el proceso de replicación del ADN.

Si durante la replicación del ADN que contiene la repetición, ocurre un deslizamiento de la cadena sintetizada sobre la cadena molde, se formará un bucle en una de las cadenas, lo que originará que la nueva cadena de ADN tenga una repetición de más o de menos con respecto a la cadena original. Este mecanismo explica los polimorfismos de longitud de los microsatélites.

Si la expansión o contracción tiene lugar en la región codificante, el resultado será la aparición de deleciones de aminoácidos o cambios en el marco de lectura, dependiendo respectivamente de si se delecionan 3 (o múltiplo de 3) nucleótidos o no.

Como ejemplo, destacar el gen *CFTR* (*602421), asociado a fibrosis quística (MIM #219700), el cual contiene una repetición en tándem de 5 timinas en los codones 142 y 143. La deleción de una timina por este fenómeno de deslizamiento dará lugar a un cambio del marco de lectura y presumiblemente, a un truncamiento prematuro de la proteína.

Enfermedad	Rango normal	Rango patológico	Gen (Chr)
Huntington disease (HD)	6-35	≥36-250	<i>HTT</i> (4p16.3)
Smith (Haw-River) (DRPLA)	3-35	≥48-93	<i>ATN</i> (12p13.31)
Kennedy (SBMA)	9-36	≥38-68	<i>AR</i> (Xq12)
SCA1	6-38	≥39-88	<i>ATXN1</i> (6p22)
SCA2	13-31	≥32-500	<i>ATXN2</i> (12q24)
SCA3/Machado-Joseph disease (MJD)	12-44	≥55-87	<i>ATXN3</i> (14q32)
SCA6	4-18	≥20-33	<i>CACNA1A</i> (19p13)
SCA7	4-33	≥37-460	<i>ATXN7</i> (3p21)
SCA17	25-42	47-63	<i>TBP</i> (6q27)

Tabla 1. Ejemplos de enfermedades por expansiones CAG en regiones codificantes.

Adaptado de Depienne C. *et al*, 2021.

Los microsatélites de tipo trinucleotídico pueden además sufrir expansiones mayores, dando lugar a un grupo de enfermedades conocidas como "enfermedades por expansión de tripletes". Dada su importancia en patología humana, las estudiamos con más detalle en el siguiente apartado.

EXPANSIÓN DE TRINUCLEÓTIDOS

Existe un grupo de enfermedades causadas por la expansión de repeticiones de trinucleótidos (o expansión de tripletes), que tienen una serie de rasgos en común y que frecuentemente presentan un fenómeno clínico conocido como "anticipación genética". Este fenómeno consiste en la aparición de enfermedad a una edad más temprana y de forma más severa en las sucesivas generaciones de una misma familia. Este fenómeno se explica por la presencia de repeticiones de trinucleótidos inestables que aumentan de tamaño en cada generación.

Las enfermedades por expansión de trinucleótidos se agrupan en dos categorías:

- Enfermedades por expansiones cortas (40 a 70 repeticiones) de un trinucleótido CAG localizado en la región codificante de un gen
- Enfermedades por expansiones mayores (de 50 hasta miles de repeticiones) de trinucleótidos en regiones no codificantes⁵.

Si bien el mecanismo de expansión más probable es por deslizamiento de cadenas, las grandes expansiones son más fáciles de explicar mediante un mecanismo de reparación por recombinación homóloga. De todas formas, se desconoce el motivo por el cual en estas secuencias son más frecuentes las expansiones que las contracciones.

• Neuropatías por expansiones de CAG

Las enfermedades del primer grupo dan como resultado la expansión de un tracto de poliglutaminas (poliQ) en la proteína codificada y constituyen un grupo de enfermedades neurodegenerativas de gran importancia (Tabla 1).

La inestabilidad de la expansión aumenta con el tamaño de la misma. Así, por debajo de 40 repeticiones, la frecuencia de expansiones es baja, pero al llegar a un rango de 40 a 100 repeticiones la inestabilidad ya es prácticamente del 100%. Además, se observan diferencias si la transmisión es materna o paterna, siendo la expansión más frecuente si la transmisión es paterna.

En general, el mecanismo patogénico propuesto consiste en una ganancia de función. Probablemente, el tracto de poliglutaminas en las proteínas conlleva al mal plegamiento y/o a la formación de agregados proteicos, lo que altera la función neuronal. Dado que el tamaño de las expansiones correlaciona con la gravedad de la enfermedad, es probable que estas enfermedades se deban a una ganancia de función con un efecto tóxico que aumenta con el número de glutaminas de la proteína, con 35-40 residuos como valor umbral.

También se ha demostrado que, para provocar degeneración neuronal es necesario que las proteínas alteradas accedan al núcleo e interactúen con factores de transcripción ricos en glutamina, alterando así la transcripción de genes necesarios para la supervivencia neuronal. En el caso concreto de la huntingtina (proteína alterada en la Enfermedad de Huntington) se ha demostrado, por ejemplo, que la expansión de glutaminas impide la expresión del gen que codifica el receptor D2 de la dopamina⁶.

• Enfermedades por otros trinucleótidos

El segundo grupo de enfermedades por expansión de tripletes incluye enfermedades más heterogéneas, que también afectan al sistema nervioso (Tabla 2). En general, el rango de 40-100 repeticiones (premutación) no se asocia a la enfermedad, pero por tratarse de un alelo inestable es más probable que se expanda a mutación

Enfermedad	Repetición	Rango normal	Rango patológico	Localización (Gen)(Chr)
Distrofia Miotónica (DM1)	CTG	5-37	>50-10,000	3' UTR (<i>DMPK</i>)(19q13.32)
X Frágil (FXS)	CGG	5-50	>200	5'UTR (<i>FMR1</i>)(Xq27.3)
X Frágil (FRAXE)	GCC	4-39	≥200-900	5' UTR (<i>AFF2</i>)(Xq28)
Ataxia Friedreich (FRDA)	GAA	5-34	≥66-1300	Intrón (<i>FXN</i>)(9q21.11)
SCA8	CTG	15-50	>74-250	3' UTR (<i>ATXN8</i>) (13q21)

Tabla 2. Ejemplos de enfermedades por expansión de trinucleótidos distintos a CAG en regiones no codificantes.

Adaptado de Depienne C. *et al*, 2021.

completa causando la enfermedad en sucesivas generaciones. Esta expansión se ve menos favorecida cuando la repetición está interrumpida por un triplete distinto. Por ejemplo, algunos alelos del gen *FMR1* (*309550) tienen repeticiones CGG interrumpidas por el trinucleótido AGG cada 10 repeticiones CGG; en estos alelos la probabilidad de expandir es menos probable.

En estas enfermedades, como regla general, el efecto patogénico es resultado de la pérdida de función de la proteína o de la alteración en la función del ARNm, ya que las expansiones están en regiones no codificantes. Aunque el número es mayor, destacamos:

- Síndrome del X frágil (MIM #300624)

Es la causa más frecuente de discapacidad intelectual hereditaria, afectando aproximadamente a 1/4.000 varones de la población general y 1/6.000 mujeres. Clínicamente se caracteriza por la presencia de discapacidad intelectual entre leve y moderada, dismorfia facial (cara alargada y triangular, orejas grandes y aladas) y macroorquidismo.

Inicialmente, se diagnosticaba mediante cariotipo por la visualización de una rotura en Xq27.3 cuando las células se cultivan en presencia de metrotexato o en ausencia de folato. Posteriormente, se identificó la expansión del trinucleótido CGG en una isla CpG de la región promotora del gen *FMR1* (*309550), 38 kb y 17 exones, como causa de la enfermedad. Fue el primer ejemplo de una enfermedad causada por la expansión de tripletes.

Las variantes patogénicas de la región codificante son raras, pero también provocan la enfermedad cuando implican disminución de la proteína FMRP, por lo que se supone que la expansión del trinucleótido también produce una pérdida de función. Esta proteína es citoplasmática y se expresa en el cerebro, así como en las células germinales de testículo. La proteína posee dominios de unión al ARN y de unión a otras proteínas, y se ha comprobado que se une a su propio mensajero, a un 4% de todos los ARNm de cerebro fetal y también a la subunidad 60S de los ribosomas. Podría por tanto entrar en el núcleo, capturar ARN mensajeros y exportarlos al citoplasma como parte de la maquinaria traduccional, específicamente aquellos cruciales para el desarrollo de las dendritas y para la función sináptica en las neuronas⁷.

- Distrofia miotónica

La distrofia miotónica se puede producir por alteraciones en 2 loci. La forma más frecuente es la distrofia miotónica tipo 1 (MIM # 160900) y se debe a la expansión del trinucleótido CTG en la región 3'UTR del gen *DMPK* (*605377), que codifica una proteína-quinasa. Se trata de una enfermedad

con herencia autosómica dominante, que se caracteriza por la presencia de miotonía muscular, cataratas y arritmias cardíacas.

La enfermedad se produce por la presencia de ARN con largas expansiones de repeticiones CUG. La hipótesis más aceptada es que la expansión da lugar a un ARN que es capaz de unirse a varias proteínas que regulan el fenómeno de *splicing*, alterando su función. Estos genes incluyen un canal de cloro, el propio *SIX5*, el gen de la troponina T, el receptor de la insulina, genes con funciones neuronales, etc. En conjunto, la sintomatología de la enfermedad es el resultado conjunto de la desregulación de todos estos genes⁸.

La distrofia miotónica tipo 2 (MIM # 602668), menos frecuente, se trata de una enfermedad con herencia dominante causada por la expansión de un tetranucleótido en el intrón 1 del gen *ZNF9* o *CNBP* (*605377). Los individuos normales tienen menos de 26 repeticiones CCTG en el intrón 1 del gen, mientras que las expansiones en pacientes van desde 75 a 11.000 repeticiones.

- Ataxia de Friedreich (MIM #229300)

Se trata de un trastorno neurodegenerativo autosómico recesivo caracterizado, entre otros signos clínicos, por una ataxia progresiva de la marcha, disartria, disfagia, y pérdida de reflejos. A diferencia de otras enfermedades por expansión, en la ataxia de Friedreich, no ocurre el fenómeno de anticipación genética.

Está causado por la expansión del trinucleótido GAA localizado en una secuencia Alu del primer intrón del gen *FRDA* (*606829), gen que codifica para la proteína frataxina. Los alelos normales están interrumpidos por la secuencia (GAGGAA)₅₋₉ y no tienen más de 32 repeticiones GAA. La expansión, en cambio, impide la transcripción del gen, al formar un intrón muy largo con estructuras de triple hélice en el ADN genómico.

Los niveles bajos de frataxina alteran la función mitocondrial, ya que esta proteína es importante en la homeostasis del hierro en la mitocondria, lo cual conlleva una disminución en la producción de energía y en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)⁹.

– Epilepsia mioclónica progresiva (MIM #254800)

La epilepsia mioclónica progresiva es un trastorno autosómico recesivo caracterizado por mioclonos de acción sensibles a estímulos y crisis tónico-clónicas acompañadas de ataxia, con un leve deterioro cognitivo a largo plazo. Se debe a la expansión de una secuencia de 12 nucleótidos (CCCCGCCCGCG). Este es el primer ejemplo de enfermedad por expansión de un minisatélite, el cual se localiza en la región promotora del gen *CSTB* (*601145, cistatina B, un inhibidor de proteasas).

Los alelos normales tienen hasta 3 repeticiones, mientras que sujetos con premutación tienen 12 a 17 repeticiones y los afectados entre 30 y 75 (en total, un tamaño de 360-900 nucleótidos). Un 14% de los individuos con esta enfermedad tienen variantes patogénicas en la región codificante del gen. La presencia de la expansión conduce a una disminución de los niveles de ARNm, probablemente debido a la desorganización del promotor del gen *CSTB*

– Ataxia espino-cerebelosa (SCA10; MIM 603516)

Se trata de una ataxia espino-cerebelosa de herencia autosómica dominante causada por la expansión de un pentanucleótido (ATTCT) en el intrón 9 del gen *ATXN10* (*611150). Los individuos normales tienen 10 a 22 repeticiones, mientras que los afectados presentan alelos con 500-4500 repeticiones.

Las enfermedades causadas por mutaciones dinámicas o expansión de tripletes suponen un grupo de alteraciones que afectan a una proporción considerable de la población si son consideradas en su conjunto. Tal y como se ha expuesto, no sólo el ADN codificante es clave para el correcto funcionamiento de la maquinaria genética del individuo, sino que también el ADN no codificante, aunque menos estudiado, es fundamental y está implicado en un gran número de enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

- 1 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. How cells read the genome: from DNA to protein. En: Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular biology of the cell: 6th ed. New York: W. W. Norton; 2017. p. 322.
- 2 McCreight JC, Schneider SE, Wilburn DB, Swanson WJ. Evolution of microRNA in primates. PLoS One. 2017 Jun 22;12(6):e0176596. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176596>
- 3 Thakur J, Packiaraj J, Henikoff S. Sequence, Chromatin and Evolution of Satellite DNA. Int J Mol Sci. 2021 Apr 21;22(9):4309. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms22094309>
- 4 Valdespino Gómez VM, Valdespino Castillo PM, Valdespino Castillo VE. Organización estructural y funcional del genoma humano: variación en el número

de copias predisponentes de enfermedades degenerativas. Gac Mex Oncol. 2013;12:426-32.

Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-organizacion-estructural-funcional-del-genoma-X1665920113687258>

- 5 Depienne C, Mandel JL. 30 years of repeat expansion disorders: What have we learned and what are the remaining challenges? Am J Hum Genet. 2021;108(5):764-85. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.03.011>
- 6 Robinson, R. Mutated huntingtin disrupts dopamine D2 receptor transcription. Lancet Neurol. 2002;1(2):78. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(02\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(02)00058-3)
- 7 Kim M, Bellini M, Ceman S. Fragile X mental retardation protein FMRP binds mRNAs in the nucleus. Mol Cell Biol. 2009;29(1):214-28. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/MCB.01377-08>
- 8 Cho DH, Tapscott SJ. Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2. Biochim Biophys Acta. 2007 Feb;1772(2):195-204. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.05.013>
- 9 Chiang S, Kovacevic Z, Sahni S, Lane DJ, Merlot AM, Kalinowski DS, Huang ML, Richardson DR. Frataxin and the molecular mechanism of mitochondrial iron-loading in Friedreich's ataxia. Clin Sci (Lond). 2016;130(11):853-70. Disponible en: <https://doi.org/10.1042/CS20160072>

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. Nat Rev Genet. 2006 Feb;7(2):85-97. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrg1767>
- Jorde LB. Genética Médica. 4ª ed. Barcelona: Elsevier; 2011.
- Lucas M. Diagnóstico molecular en genética médica. Barcelona: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 1998.
- Novo Villaverde FJ. Genética humana. Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la genética en el campo de la biomedicina. Barcelona: Prentice Hall; 2007.
- Nussbaum R, McInnes R, Willard H. Thompson and Thompson. Genética en Medicina. 7ª ed. Barcelona: Masson; 2008.
- Pierce B. Genética. Un enfoque conceptual. 3ª ed. Barcelona: Editorial Médica Panamericana; 2009.
- Sánchez R, Varo GM, Rueda D. Manual de genética y biología molecular. Madrid: Asociación Española de Biopatología Médica; 2016.
- Solari AJ. Genética humana. 4ª ed. Barcelona: Editorial Médica Panamericana; 2000.

SÍNDROMES DE DELECCIÓN ÚNICA EN EL ADN MITOCONDRIAL

Autores: Fernando Calvo Boyero; Adrián González Quintana; Miguel Ángel Martín Casanueva

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

Palabras clave: ADN mitocondrial (mtDNA), Delección única del mtDNA, Enfermedad mitocondrial

INTRODUCCIÓN

El primero de estos síndromes mitocondriales de delección única del ADN mitocondrial (mtDNA) de tamaño grande (del inglés, “*single large-scale mtDNA deletion*”) se publicó por primera vez en el año 1958 por los doctores TP Kearns y GP Sayre¹, acuñando el nombre de Síndrome de Kearns-Sayre. Se describía un paciente con retinitis pigmentosa, oftalmoplejía externa y bloqueo cardíaco.

Posteriormente, a finales de los 80, se observó que estos pacientes tenían una alteración en el genoma mitocondrial. El ADN mitocondrial (mtDNA) tiene un tamaño de 16.569 pares de bases, es un ADN circular de doble cadena, localizado en las mitocondrias de las células. Cada célula contiene varias copias de mtDNA. Los pacientes con estos síndromes presentan una delección única o simple (pérdida de material genético) de gran tamaño en una fracción de las moléculas de mtDNA en uno o varios tejidos (heteroplasmia del mtDNA), que puede variar desde 1.100 a 10.000 pares de bases².

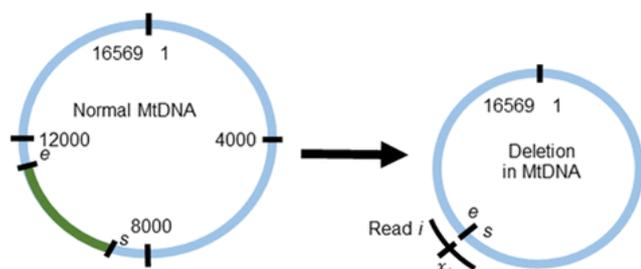


Figura 1. Delección única en el mtDNA. Adaptado de: Schaefer *et al*, 2008.

PATOGÉNESIS

• Prevalencia

En base a un estudio epidemiológico de una población adulta en el noreste de Inglaterra se encontraron 18 pacientes en una población de estudio de 1.535.800 individuos, por lo que la prevalencia estimada de delección única de mtDNA fue de 1,2:100.000 pacientes².

• Herencia

Las alteraciones genéticas en el mtDNA se transmiten exclusivamente por la rama materna, ya que durante el proceso de fecundación las mitocondrias del ovocito son las que se encontraban en el óvulo materno. Los síndromes de delección única de mtDNA casi nunca se heredan, lo que sugiere que estos trastornos son causados por delecciones *de novo* que ocurren en los ovocitos de la madre durante el desarrollo de la línea germinal o en el embrión durante la

embriogénesis. Podría darse el caso de que la madre tuviera la delección únicamente en sus ovocitos (mosaicismo germinal). De esta manera podría transmitir la delección sin estar afectada por la enfermedad. En estos casos se estima que el riesgo de transmisión es de 1-4% en cada nueva fecundación².

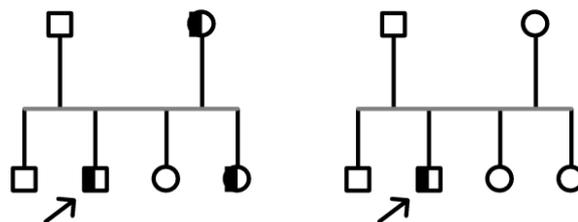


Figura 2. Patrones de herencia de los síndromes de delección única mitocondrial. **Izquierda:** Probando (varón) con madre afecta. El riesgo de recurrencia de la enfermedad es hasta un 50% en cada nuevo embarazo. La hija afecta tiene la misma probabilidad que la madre para transmitir la enfermedad. **Derecha:** Probando (varón) con madre no afecta, por lo que la delección se ha generado *de novo*. Las probabilidades de recurrencia son inferiores al 1%, salvo en el caso de que exista un mosaicismo germinal, donde el riesgo de recurrencia estimado en cada nuevo embarazo es de 1-4%. Elaboración propia a partir de datos de GeneReviews, 2019.

• Mecanismo

El origen de las delecciones en el mtDNA es incierto. Sin embargo, según su estructura se dividen en dos clases:

- **Clase I:** Aquellas flanqueadas por repeticiones directas. Se producen por recombinación homóloga o emparejamiento incorrecto.
- **Clase II:** No flanqueadas por ningún elemento único. El mecanismo es desconocido.

En el mecanismo de clase I (Figura 3) se debate que al existir dos regiones homólogas, es decir, con una misma secuencia corta de nucleótidos, en la cadena de mtDNA (zonas grises y negras, Figura 3), se pueden producir errores en la recombinación. Una rotura en la cadena pesada de mtDNA puede producir que ésta se desplace y se empareje con la otra zona homóloga, sintetizándose una cadena de menor tamaño con una región delecionada.

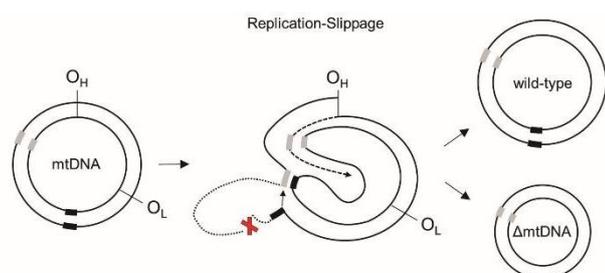


Figura 3. Mecanismo de clase I de emparejamiento incorrecto en la replicación del mtDNA. Adaptado de Oliveira MT, 2020.

Recientemente, se ha identificado un nuevo mecanismo de generación de grandes deleciones de mtDNA. En este estudio⁵ se identificó en una paciente una delección única en el mtDNA de un tamaño de 5.440 pb (m.8629_14068del5440) presente en un 68% de heteroplasmia en fibroblastos y un 16% en células sanguíneas. Además, se identificó una variante en heterocigosis c.79G>A (p.E27K) en el gen *SSBP1* que ocurrió *de novo*. La proteína SSBP1 (del inglés “single strand binding protein 1”) interviene en la replicación del mtDNA. Ciertos ensayos funcionales revelaron que el cambio p.E27K alteraba la capacidad de unión de SSBP1 al mtDNA. Por lo tanto, una delección única de mtDNA con manifestaciones en el espectro clínico de los síndromes de delección única del mtDNA puede ser consecuencia del efecto de una variante en un gen nuclear.

Hasta la fecha se han descrito 157 deleciones según la base de variantes humanas en mtDNA [MitoMap](#). Entre ellas existe una que se encuentra en alrededor de un tercio de los pacientes con síndromes de delección única, que se conoce como “delección común”. Esta delección común consiste en la eliminación de 4.977 pares de bases (m.8470_13447del4977) y es debida a una homología en la secuencia de nucleótidos (ACCTCCCTCACCA) entre las regiones 8470-8482 y 13447-13459 del mtDNA.

SÍNDROMES DE DELECCIÓN ÚNICA MITOCONDRIAL

Existen tres grandes síndromes clínicos que se asocian clásicamente con delección única a gran escala del mtDNA:

- Síndrome de Kearns-Sayre (MIM #530000).
- Síndrome de Pearson (MIM #557000).
- Oftalmoplejía crónica progresiva externa (MIM #157640).

- **Síndrome de Kearns Sayre (SKS)**

Se presenta antes de los 20 años con una tríada clásica de síntomas, seguida de la aparición progresiva de otras características clínicas, dependiendo de la distribución tisular de la anomalía molecular²:

- **Retinopatía pigmentaria:** Deterioro progresivo de la visión debido a distrofia de conos y bastones. También se describe como retinopatía en sal y pimienta, debido a la alteración característica que se encuentra en el fondo de ojo (Figura 4).

- **Oftalmoplejía externa progresiva**, que incluye ptosis.
- **Anomalía de la conducción cardíaca.** Es característico el bloqueo aurículo-ventricular con bloqueo incompleto de rama derecha.



Figura 4. Retinopatía en patrón de “sal y pimienta”. Tomado de Hamel, 2006.

La enfermedad progresa lentamente durante décadas desarrollando nuevos síntomas que van acompañados de un empeoramiento lento de los síntomas previos. Otros síntomas asociados con mayor frecuencia a este trastorno incluyen²:

- Pérdida auditiva neurosensorial bilateral.
- Afectación cardíaca (miocardiopatía).
- Afectación del Sistema nervioso central (ataxia cerebelosa, disartria, debilidad facial bilateral, discapacidad intelectual).
- Miopatía del músculo esquelético.
- Trastornos intestinales y endocrinos (retraso puberal, hipoparatiroidismo, diabetes).
- Insuficiencia renal (Síndrome de Fanconi).

Existe una cierta variabilidad en los signos y síntomas encontrados en estos pacientes. En este estudio⁷ con 86 pacientes describieron los síntomas que se observan en la Tabla 1.

Signo o síntoma	Presentes/Evaluados	Porcentaje
Edad de inicio <20 años	86/86	100%
Retinopatía pigmentaria	86/86	100%
PEO	86/86	100%
Síndrome cerebeloso	53/63	84%
Debilidad de las extremidades	61/65	94%
Hipoacusia neurosensorial	33/34	97%
Discapacidad intelectual	25/29	86%
Diabetes mellitus	11/86	13%
Convulsiones	2/86	2%

Tabla 1. Descripción de signos y síntomas encontrados en pacientes con SKS. Adaptado de: Brain *et al*, 2014.

En cuanto al diagnóstico de laboratorio, el estudio de la biopsia muscular muestra fibras rojas rasgadas (RRF del inglés “ragged red fibers”) o fibras azules rasgadas (RBF del inglés “ragged blue fibers) y fibras citocromo c oxidasa (COX) negativas en prácticamente todos los pacientes. Además, el estudio bioquímico de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial en el tejido muscular suele mostrar una

disminución de la actividad de los complejos enzimáticos que la forman y que contienen subunidades codificadas por el mtDNA (complejos I, III y IV).

En cuanto al tratamiento, no existe una terapia específica, y el único tratamiento es de apoyo⁸. En aquellos casos con bloqueo cardíaco de alto grado, se puede sugerir la implantación de un marcapasos permanente/desfibrilador cardioversor implantable, mejorando el pronóstico. A los pacientes con pérdida auditiva neurosensorial se les puede proporcionar audífonos.

El pronóstico depende fundamentalmente del número de órganos afectados y de la proporción de mtDNA deletado en cada uno de ellos. En la mayoría de los casos, con una adecuada atención médica, la esperanza de vida no se ve afectada.

• Síndrome de Pearson (SP)

Se presenta en la infancia (algunos casos neonatales) con dos síntomas característicos^{2,9}:

- **Anemia sideroblástica.** Se pueden observar sideroblastos en anillo, que pueden detectarse mediante tinción de Perls en la médula ósea (Figura 5). Normalmente el paciente es dependiente de transfusiones hasta su resolución en la infancia.
- **Disfunción exocrina del páncreas.** Se produce un aumento de la grasa fecal, identificado por tinción Sudán III de heces o cuantitativamente determinando su porcentaje por espectrofotometría.

También pueden aparecer otros síntomas como trombocitopenia, leucopenia, hepatopatía, fallo renal, endocrinopatías, etc.

El manejo terapéutico es sintomático e incluye el tratamiento de los episodios infecciosos y de los problemas metabólicos, transfusión en caso de anemia grave (en ocasiones se asocia a terapia con eritropoyetina), toma de extractos pancreáticos y el manejo de los trastornos endocrinos.

En cuanto al pronóstico, los pacientes suelen fallecer antes de alcanzar los tres años, debido a los riesgos de sepsis, las crisis con acidosis láctica o el fallo hepatocelular.

Los pacientes que sobreviven a la infancia temprana siguen una evolución fenotípica: los signos hematológicos se resuelven de forma espontánea, debido a una disminución gradual del porcentaje de mtDNA con la delección a consecuencia de una continua renovación de las células progenitoras hematopoyéticas. Sin embargo, aparecen secuelas neurológicas y algunos pacientes desarrollan síndrome de Kearns-Sayre debido a un aumento del porcentaje de mtDNA con delección única en tejidos post-mitóticos.

• Oftalmoplejía Crónica Progresiva Externa (CPEO)

Se manifiesta principalmente en los adultos. Es una enfermedad relativamente leve que afecta únicamente a nivel muscular. La CPEO se caracteriza por:

- **Ptosis:** Debilidad progresiva de los músculos oculares y del músculo elevador del párpado superior.
- **Oftalmoplejía:** Parálisis de los músculos extraoculares.
- **Debilidad muscular proximal e intolerancia al ejercicio,** en ocasiones.

En ocasiones, algunos pacientes con CPEO desarrollan de forma progresiva síntomas en otros órganos o sistemas. En estos casos, la enfermedad se denomina CPEO-plus o *SKS spectrum*. La presentación clínica es menos grave que la típica del SKS clásico, pero incluye síntomas multisistémicos más allá de los propios de la CPEO.

Un análisis retrospectivo en una cohorte italiana de 253 pacientes con delección única de mtDNA mostró que el 6,6% presentaba SKS clásico, el 31,6% cumplía los criterios para el espectro de SKS, el 64,5% tenía CPEO y el 2,6% tenía síndrome de Pearson.

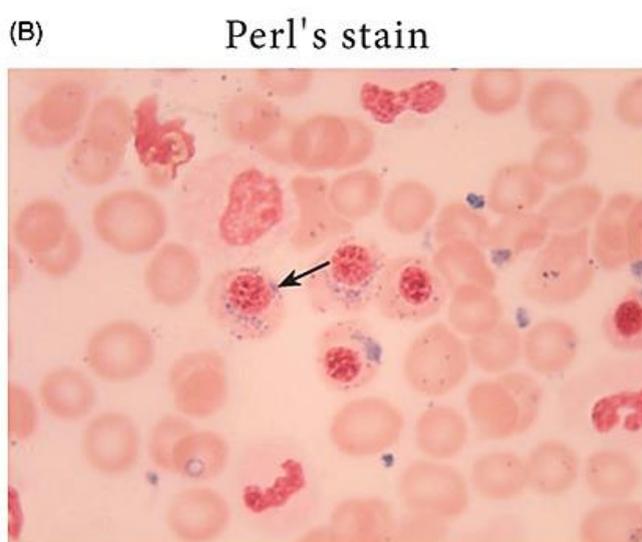
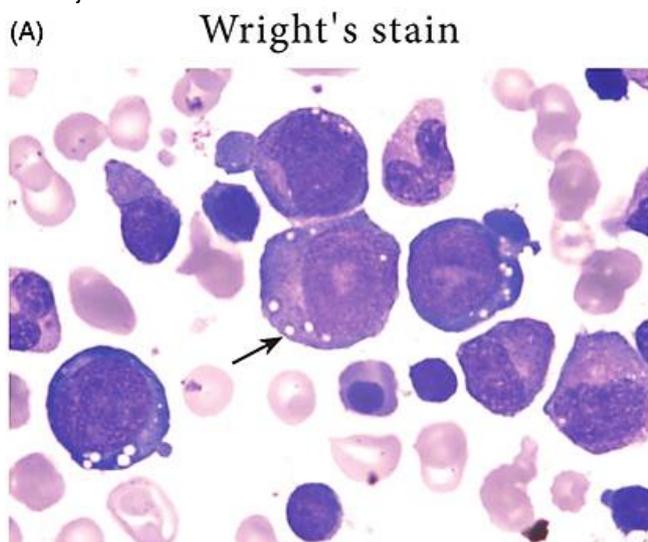


Figura 5. Anomalías sanguíneas detectadas en un Síndrome de Pearson. **(A)** La presencia de vacuolización en los progenitores granulares y eritroblásticos, visibles en el mielograma, que son signos típicos de este síndrome. **(B)** La tinción de Perls revela la presencia de sideroblastos en anillo. Tomado de: Chen *et al*, 2016.

Los tres síndromes comparten síntomas entre sí, pero presentan alteraciones características que permiten realizar un diagnóstico clínico diferencial entre las tres patologías (Tabla 2).

Sistema	Signo o Síntoma	SKS	SP	CPEO
SNC	Ataxia, Retraso psicomotor	+		
	Neuropatía periférica	±		
Músculo	Debilidad muscular e intolerancia al ejercicio	+		+
	Oftalmoplejía Ptosis	+	±	+
Ojo	Retinopatía pigmentaria	+		
Sangre	Anemia sideroblástica	±	+	
Endocrino	DM, estatura corta, hipoparatiroidismo	±		
Corazón	Trastornos conducción cardiaca	+		+
Gastrointestinal	Disfunción pancreática exocrina	±	+	
Oído	Hipoacusia	±		
Riñón	Síndrome de Fanconi	±	±	
Laboratorio	Acidosis láctica	+	+	±
	Fibras rojo-rasgadas (RRF)	+	±	+

Tabla 2. Diagnóstico diferencial entre los tres síndromes de delección mitocondrial. +: Presente en la mayoría de los pacientes; ±: Presente en una parte de los pacientes; +: Signo o síntoma muy característico del síndrome; -: Signo o síntoma que no aparece de forma característica en el síndrome. Adaptado de: DiMauro *et al*, 2003.

CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

En estos síndromes es muy característica la variabilidad clínica de los pacientes.

Dado que los pacientes con la delección "común" muestran diferentes síntomas clínicos, se postula que otros factores contribuyen a la heterogeneidad fenotípica observada:

- Abundancia relativa de mtDNA deleccionado (heteroplasmia).
- Distribución tisular de las copias de mtDNA deleccionado.
- Vulnerabilidad de los tejidos a la disfunción del metabolismo oxidativo (efecto umbral)

Esto es debido al porcentaje de mtDNA deleccionado (heteroplasmia) en cada uno de los tejidos en cada paciente. Los tejidos que presenten elevada heteroplasmia presentarán una disfunción mitocondrial mayor, y por tanto, unos síntomas más graves.

Se postula que, desde el blastocisto, los mtDNA con la delección pueden ingresar ya sea a las tres capas germinales para originar SKS, segregarse de forma predominante en el linaje hematopoyético y en otros tejidos mitóticos para causar SP, o segregarse en el músculo esquelético para causar CPEO.

En relación con la edad de presentación, se ha encontrado una correlación inversa con la heteroplasmia; sin embargo,

no se ha encontrado correlación con el número de genes deleccionados ni con el tamaño de la delección^{3,10,11}.

Por otra parte, no se ha encontrado una clara correlación entre la gravedad clínica y el tipo, tamaño o ubicación de la delección.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Se pueden utilizar diferentes técnicas en función del objetivo buscado. En primer lugar, ante una sospecha de un síndrome de delección única mitocondrial, hay que identificar esta delección en una muestra tisular del paciente. Para intentar correlacionar el grado de moléculas mtDNA deleccionadas con la gravedad de los síntomas, hay que cuantificar la heteroplasmia de la delección en el tejido. Además, también se puede caracterizar el tamaño y mapear la delección en el mtDNA (identificar los puntos de ruptura – *breakpoints* -)

• Detección de la delección

Secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS) o Southern blot de tejido con alta heteroplasmia de delección mitocondrial (Figura 6).

- SKS: Leucocitos sanguíneos, muestra bucal o células epiteliales del sedimento de orina. Sin embargo, para establecer el diagnóstico es necesaria una biopsia muscular si las pruebas en otros tejidos no son concluyentes.
- SP: Leucocitos sanguíneos.
- CPEO: Músculo esquelético.

• Cuantificación de heteroplasmia

Densitometría óptica de las bandas de mtDNA de la membrana del Southern blot (Figura 6).

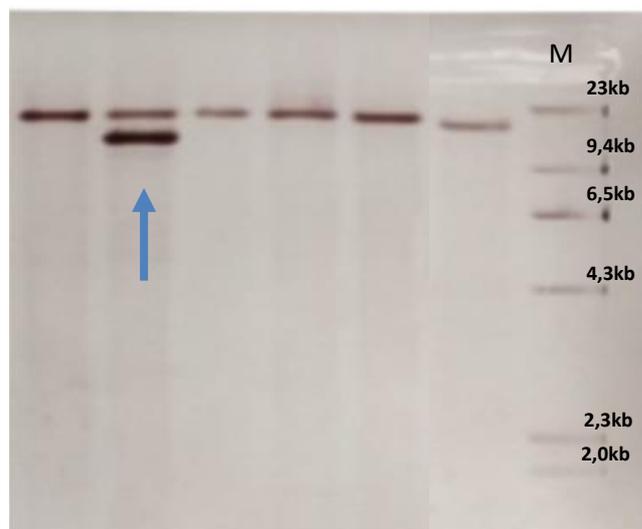


Figura 6. Técnica Southern blot en tejido muscular en un paciente con sospecha de SKS. M: marcador de peso molecular. En la muestra señalada con la flecha se observan dos bandas, que corresponden al mtDNA de tamaño normal 16,5 Kb (banda superior) y mtDNA deleccionado (banda inferior). Se observa una intensidad mayor en la banda inferior con respecto a la superior. Mediante densitometría óptica de la imagen escaneada, se puede estimar el porcentaje de heteroplasmia, siendo en este caso de un 80%. Elaboración propia.

• **Mapeo de la deleción:**

NGS o secuenciación con cebadores (“primers”) dirigidos (Figura 7).

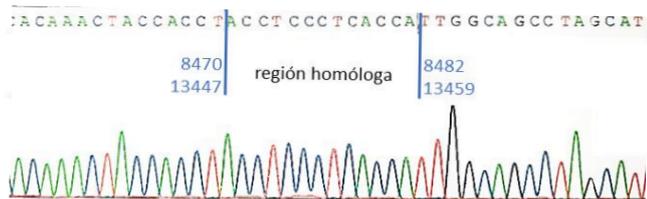


Figura 7. Secuenciación del mtDNA, donde al comparar con el genoma de referencia, se detecta un “salto” de la posición nucleotídica del mtDNA 8470 a la 13447, debido a una región homóloga. Se determina una deleción de 4977 pb (m.8470_13447del4977), se corresponde con la “deleción común”. Elaboración propia.

ENVEJECIMIENTO

Se ha estudiado la presencia de la deleción común mitocondrial en diferentes tejidos en relación con el envejecimiento y con enfermedades relacionadas con la edad, como síndrome metabólico, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad cardíaca o cáncer¹².

Estudios recientes¹³ han demostrado que la presencia de la deleción común predispone a una mayor sensibilidad al estrés oxidativo y, por lo tanto, a desencadenar apoptosis.

Se ha demostrado que diferentes órganos o incluso diferentes áreas de un mismo órgano acumulan la deleción de 4977 pb a diferentes velocidades, con diferencias de hasta más de tres órdenes de magnitud. Esto sugiere que podría utilizarse como biomarcador para valorar los cambios relacionados con la edad en un tejido determinado.

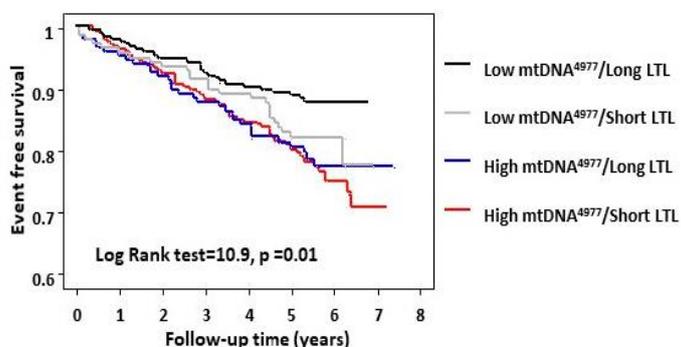
Otros estudios han demostrado la relación de un acortamiento de los telómeros y/o una mayor heteroplasmia

en linfocitos en eventos adversos cardiovasculares mayores y mortalidad por todas las causas (Figura 8), por lo que la determinación de estos marcadores pueden ser prometedores para el pronóstico de enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. Kearns TP, Sayre GP. Retinitis Pigmentosa, External Ophthalmoplegia, and Complete Heart Block: Unusual Syndrome with Histologic Study in One of Two Cases. *AMA Arch Ophthalmol.* 1958 Aug 1;60(2):280-9.
2. DiMauro S, Hirano M. Mitochondrial DNA Deletion Syndromes. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., ed. *GeneReviews*(®). Seattle. University of Washington; 2019.
3. Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, He L, Whittaker RG, Taylor RW, et al. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol.* 2008 Jan;63(1):35-9.
4. Oliveira MT, Pontes CB, Ciesielski GL. Roles of the mitochondrial replisome in mitochondrial DNA deletion formation. *Genet Mol Biol.* 2020;43(1 Suppl. 1):e20190069
5. Gustafson MA, McCormick EM, Perera L, Longley MJ, Bai R, Kong J, et al. Mitochondrial single-stranded DNA binding protein novel de novo SSBP1 mutation in a child with single large-scale mtDNA deletion (SLSMD) clinically manifesting as Pearson, Kearns-Sayre, and Leigh syndromes. *PLoS One.* 2019 Sep 1;14(9).
6. Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis.* 2006 Oct 11;1:40.
7. Grady JP, Campbell G, Ratnaike T, Blakely EL, Falkous G, Nesbitt V, et al. Disease progression in patients with single, large-scale mitochondrial DNA deletions. *Brain.* 2014;137(2):323-34.
8. Finsterer J. Orphanet: Síndrome de Kearns Sayre [Internet]. 2019 [consultado 4 diciembre 2021].

MACEs



All-cause mortality

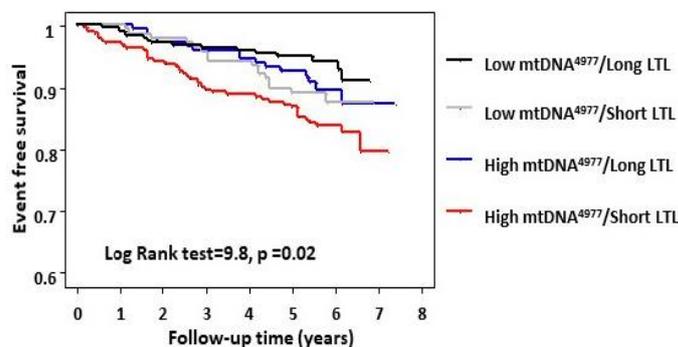


Figura 8. Gráfica de Kaplan Meier comparando diferentes eventos clínicos con la heteroplasmia de la deleción común mitocondrial y la longitud telomérica de leucocitos. **Izquierda:** Se observa un incremento significativo ($p = 0,01$) de eventos adversos cardiovasculares mayores (MACEs) en pacientes con alta heteroplasmia de la deleción común y/o acortamiento de telómeros. **Derecha:** Se observa un incremento significativo ($p = 0,02$) de mortalidad por todas las causas en las mismas situaciones. Tomado de: Vecoli *et al*, 2019.

Disponible en: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=ES&Expert=480

9. Farruggia P, Di Cataldo A, Pinto RM, Palmisani E, Macaluso A, Valvo L Lo, et al. Pearson Syndrome: A Retrospective Cohort Study from the Marrow Failure Study Group of A.I.E.O.P. (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). *JIMD Rep.* 2016;26:37-43.
10. Broomfield A, Sweeney MG, Woodward CE, Fratter C, Morris AM, Leonard JV, et al. Paediatric single mitochondrial DNA deletion disorders: an overlapping spectrum of disease. *J Inherit Metab Dis.* 2015 May 16;38(3):445-57.
11. Pitceathly RD, Rahman S, Hanna MG. Single deletions in mitochondrial DNA--molecular mechanisms and disease phenotypes in clinical practice. *Neuromuscul Disord.* 2012 Jul;22(7):577-86
12. Srivastava S. The Mitochondrial Basis of Aging and Age-Related Disorders. *Genes (Basel).* 2017 Dec 19;8(12):398.
13. Meissner C, Bruse P, Mohamed SA, Schulz A, Warnk H, Storm T, et al. The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: A useful biomarker or more? *Exp Gerontol.* 2008 Jul;43(7):645-52.
14. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *N Engl J Med.* 2003 Jun 26;348(26):2656-68.
15. Chen XY, Zhao SY, Wang Y, Wang D, Dong CH, Yang Y, et al. A novel mitochondrial DNA deletion in a patient with Pearson syndrome and neonatal diabetes mellitus provides insight into disease etiology, severity and progression. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.* 2016 Jul;27(4):2492-5.
16. Vecoli C, Borghini A, Pulignani S, Mercuri A, Turchi S, Picano E, et al. Independent and combined effects of telomere shortening and mtDNA4977 deletion on long-term outcomes of patients with coronary artery disease. 2019 Nov 5;20(21):5508.

ATROFIA ÓPTICA DOMINANTE: PAPEL DE OPA1 Y REPERCUSIÓN MITOCONDRIAL

Autores: Maialen Palomino Alonso; Alberto Blázquez Encinar; Miguel Ángel Martín Casanueva

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

Palabras clave: OPA1, Enfermedades mitocondriales, Atrofia óptica dominante

INTRODUCCIÓN

• Mitocondrias

Las mitocondrias son orgánulos presentes en prácticamente todas las células eucariotas. Su función principal es generar energía en forma de Adenosín Trifosfato (ATP) mediante el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), pero también participan en otros procesos celulares como apoptosis o señalización celular por calcio y especies reactivas de oxígeno (ROS). Presentan su propio material genético, el ADN mitocondrial (ADNmt) el cual está constituido por 37 genes: 2 ARN ribosómicos (ARNr), 22 ARN de transferencia (ARNt) y 13 subunidades estructurales del sistema OXPHOS. Sin embargo, la mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas por el núcleo¹.

Las enfermedades mitocondriales son un grupo heterogéneo de trastornos genéticos de baja prevalencia (1/5.000-10.000), derivados generalmente de un defecto en la cadena respiratoria o el sistema OXPHOS. Pueden ser causadas tanto por mutaciones en el ADNmt, con herencia materna o de *novo*, como por mutaciones en el ADN nuclear (ADNn) con herencia mendeliana, autosómica dominante, recesiva o ligada al X, pudiendo existir casos de *novo*.

• Atrofia óptica dominante (DOA)

La atrofia óptica dominante es una enfermedad progresiva caracterizada por pérdida de visión, derivada de la degeneración selectiva de las células ganglionares de la retina (CGR) y sus correspondientes axones que constituyen el nervio óptico.

En el año 2000 se identificó OPA1 como el principal gen responsable de la enfermedad. Aunque está localizado en el ADNn (3q28-q29) se trata de una enfermedad mitocondrial ya que codifica para una proteína GTPasa relacionada con la dinamina que se encuentra vinculada a la membrana mitocondrial interna (MMI). Es por ello que se define como una enfermedad mitocondrial de origen nuclear frente a la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), la otra forma más común de neuropatía óptica, cuya causa son mutaciones en genes mitocondriales: m.3460G>A (*MT-ND1*), m.11778G>A (*MT-ND4*) y m.14484T>C (*MT-ND6*).

CLÍNICA EN DOA. RASGOS COMUNES

Paul Kjer y Wolfgang Jäger fueron los primeros oftalmólogos en establecer una forma dominante de atrofia óptica aislada, que además era genética y clínicamente distinta al LHON.

El inicio de los síntomas comienza durante la primera década de vida, pero el diagnóstico no suele ser hasta prácticamente

la segunda década, debido a la dificultad de apreciar en los niños la pérdida de visión por parte de sus padres.

Suele presentarse como pérdida de visión bilateral, pero puede ocurrir también asimétricamente.

- La perimetría del campo visual muestra un escotoma bilateral central o centro-caudal.
- El examen del fondo de ojo revela una zona estereotípica blanca o gris en forma de cuña, principalmente en la porción temporal del disco óptico.
- Mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) se observa una reducción del grosor de la capa de fibras nerviosas de la retina. Esto se relaciona con la pérdida prominente de CGR en el cuadrante temporal, especialmente en la zona del haz papilomacular, correspondiente a los defectos del campo visual central. Además, las imágenes OCT angiográficas muestran una reducción del flujo sanguíneo en la región temporal del disco óptico.

La alteración de la percepción de los colores refleja una discromatopsia generalizada, que suele ocurrir en el espectro del azul-amarillo (frente al rojo-verde de los pacientes LHON). Sin embargo, no se afecta el reflejo pupilar ni los ritmos circadianos, ya que las células intrínsecamente fotosensibles que expresan la melanopsina parecen no afectarse durante el curso de la enfermedad, a pesar de estar físicamente próximas a las CGR.

EXPANDIENDO FENOTIPOS Y GENOTIPOS

En relación a la DOA, en la misma familia las características se pueden presentar con marcadas diferencias tanto en la gravedad como en el curso de la progresión de la enfermedad. Además, es genéticamente heterogénea, con un aumento de los loci y genes causantes de la enfermedad desde la introducción de la NGS (*Next Generation Sequencing*).

Un 70% de los pacientes presenta mutaciones en OPA1, donde las variantes son establemente heredadas dentro familia. Sin embargo, la historia familiar a veces no resulta informativa debido tanto a una expresión subclínica, como a una penetrancia reducida. Hay descritas pocas variantes de *novo*.

También se han asociado otros genes a la enfermedad (tabla 1), que fueron identificados primero como causantes de otros síndromes y posteriormente se demostró que además podían ser responsables de DOA no sindrómica.

En relación a las mutaciones en *OPA1*, la atrofia óptica es el rasgo común que define a los individuos afectados, sin embargo, diferentes variantes del gen se pueden asociar a distintos fenotipos.

- **Fenotipo 1. Atrofia óptica 1 (DOA1) o atrofia óptica tipo Kjer (#165500)**

Es la forma clásica predominante, de herencia autosómica dominante y caracterizada por la presencia únicamente de atrofia óptica.

- **Fenotipo 2. Síndrome DOA-plus (#125250)**

Un 20% de los pacientes presenta una forma autosómica dominante de afectación multisistémica, presentando una forma sindrómica de la enfermedad, denominada DOA-plus. Como sintomatología adicional puede presentar:

- Miopatía.
- Neuropatía periférica.
- Ataxia.
- Encefalopatía.
- Sordera neurosensorial.
- Oftalmoplejia externa progresiva.

Únicamente se han descrito mutaciones *missense*, con una correlación peculiar genotipo-fenotipo vinculada a la variante p.(Arg500His), que genera atrofia óptica y sordera neurosensorial.

Estudios en biopsia de músculo esquelético han demostrado la presencia de deleciones en el ADNmt en combinación con fibras musculares COX-negativas (citocromo c oxidasa).

- **Fenotipo 3. Síndrome de Behr (#210000)**

Otro fenotipo que se asocia a mutaciones bialélicas de *OPA1* es el denominado síndrome de Behr, de forma autosómica recesiva. Se presenta clínicamente como una enfermedad sindrómica neurológica con:

- Atrofia óptica espástica de comienzo precoz
- Ataxia espinocerebelar
- Neuropatía periférica
- Inmovilidad gastrointestinal
- Discapacidad intelectual

La mayoría de los casos son heterocigotos compuestos con una variante hipomórfica junto con otra variante de pérdida de función. Una de las más estudiadas es la c.1311A>G (p.Ile437Met), que:

- No resulta patogénica como tal, incluso en homocigosis.
- Produce un fenotipo bioquímico y mitocondrial benigno.
- Puede actuar como modificador asociado al síndrome de Behr, si ocurre en combinación con una variante de *OPA1* en trans con pérdida de función.

Aunque sí ha sido descrito un paciente con mutación bialélica y atrofia óptica aislada, no se han descrito pacientes con variantes bialélicas de pérdida de función, probablemente porque son embriológicamente letales y generan abortos.

- **Fenotipo 5. Glaucoma con tensión normal (#606657)**

Variantes polimórficas específicas de *OPA1* se han asociado a glaucoma con tensión normal, pero no con alta tensión.

- **Otros fenotipos**

También se han descrito de forma ocasional en algunos pacientes asociaciones raras de mutaciones heterocigotas o bialélicas de *OPA1*, con:

- Atrofia óptica y parestesia espástica.
- Síndrome similar a esclerosis múltiple.
- Parkinsonismo y demencia sindrómicos.
- Cardiomiopatía sindrómica severa asociada a miopatía y encefalopatía (Fenotipo 4: síndrome de depleción mitocondrial, MTDS14) (# 616896).
- Síndrome tipo Behr con accidente cerebrovascular metabólico

Todo esto resalta la complejidad de los fenotipos ligados a este gen. La dificultad para demostrar una clara correlación genotipo-fenotipo en las enfermedades asociadas a *OPA1* está además apoyada por la variabilidad en la gravedad de la clínica tanto entre familias como dentro de la misma familia, que portan la misma mutación.

GENÉTICA Y FACTORES DE RIESGO EN DOA

- **Estructura y expresión de *OPA1***

La asociación de *OPA1* con DOA estableció el primer vínculo entre una enfermedad mitocondrial y un proceso no directamente relacionado con la cadena respiratoria. De hecho, los ortólogos en la gemación (*Mgm1*) y fisión (*Msp1*) de levaduras están involucrados en fusión de membrana y mantenimiento del genoma mitocondrial.

Tanto *OPA1*, como *MGM1* y *MSP1* presentan secuencias conservadas relacionadas con la dinamina (figura 1a), formadas por un dominio GTPasa, un dominio central *middle stalk* y un dominio efector GTPasa (GED) *coiled coil*, además de una secuencia diana mitocondrial (MTS) en la región N-terminal encargada de la importación proteica a este orgánulo.

El gen *OPA1* presenta una expresión ubicua, hallándose en todas las células nucleadas del organismo. Presenta 30 exones codificantes junto con uno no codificante, de los cuales el 4, 4b y 5b sufren *splicing* alternativo para generar 8 transcritos que se traducen en 8 isoformas de proteína (figura 1b). Recientemente se han descrito otros dos transcritos (9 y 10) que contienen un exón extra no codificante. Esto genera un codón de inicio alternativo dentro del exón 3, traducándose en proteínas con una región N-terminal más corta, carente de MTS, lo que impide su importación a la mitocondria.

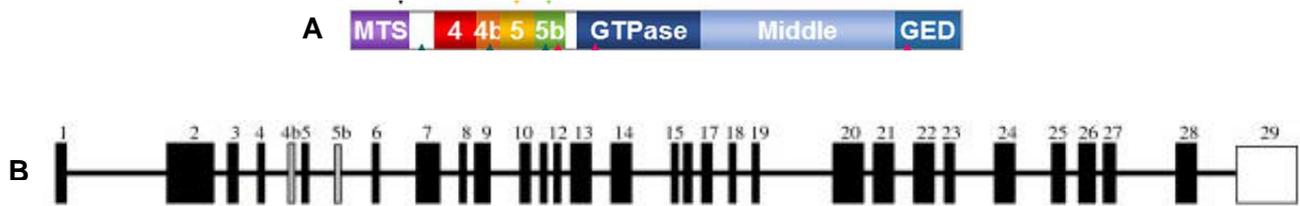


Figura 1. A) Dominios del gen OPA1. Presenta tres secuencias altamente conservadas relacionadas con la dinamina: un dominio GTPasa, un dominio central (*middle stalk*) y un dominio efector GTPasa (GED). Además, hay una secuencia diana mitocondrial (MTS) en la región N-terminal que se encarga de la importación proteica a este orgánulo. Tomado de: del Dotto V. *et al*, 2018. **B)** Estructura de OPA1, presentando 30 exones codificantes (cajas negras) junto con uno no codificante (caja blanca). Los exones 4, 4b y 5b son los que sufren *splicing* alternativo para generar las 8 isoformas de la proteína. Tomado de: Almind, G.J. *et al*. 2011.

Las funciones de *OPA1* son reguladas por cortes proteolíticos post-traduccionales, con lo que se generan diversas isoformas de distintos tamaños y funciones.

Así, una vez que las proteínas son importadas a la mitocondria, una peptidasa elimina los primeros 80 aminoácidos, que corresponden al MTS. Se genera la isoforma larga (l-OPA1) que presenta el dominio N-terminal hidrofóbico transmembrana expuesto, quedando la l-OPA1 anclada a la MMI.

Por otra parte, los exones 5 y 5b codifican para otros dos puntos de corte: S1 y S2 respectivamente, que se encuentran en una región posterior a la zona de anclaje transmembrana. El corte inducible por la peptidasa OMA1 (en S1) o constitutivo por la proteasa YME1L (en S2) generan las formas cortas solubles (s-OPA1) localizadas en el espacio intermembrana y el lumen de las crestas, debido a la pérdida del anclaje transmembrana.

Además, las proteasas SPG7 y AG3L2 regulan a YME1L y OMA1. Esto explica por qué mutaciones dominantes en estas dos proteínas reguladoras generan redes mitocondriales fragmentadas y puedan derivar en el mismo fenotipo que mutaciones en *OPA1*.

• Funciones de OPA1 como una “navaja suiza”

OPA1 presenta dos funciones primarias intra e intermitocondriales, fundamentales para el mantenimiento de otras funciones secundarias esenciales en la mitocondria. Así Lenaers *et al* describen a *OPA1* como una “navaja suiza” mitocondrial (figura 2).

1. Funciones primarias. Al ser una GTPasa relacionada con la dinamina *OPA1* forma estructuras homopoliméricas altamente complejas. Resulta en la formación de andamios cilíndricos que envuelven la MMI.
 - Remodelación de la estructura de las crestas.
 - Fusión de la MMI entre dos mitocondrias.
2. Funciones secundarias, que se encuentran relacionadas:
 - Regulación del ensamblaje de los supercomplejos respiratorios y de la eficiencia respiratoria. La alteración estructural de las crestas afecta

directamente a la producción energética en la mitocondria, ya que es donde se localizan tanto los componentes de la cadena respiratoria como la ATP sintasa.

- Regulación de la captación del calcio mitocondrial.
- Mantenimiento del citocromo c y control de la apoptosis.
- Mantenimiento del ADNmt, realizando *OPA1* un papel de manera directa e indirecta.

Para la correcta funcionalidad de *OPA1* son esenciales todas las isoformas, siendo también muy importantes los procesos de generación y equilibrio de las mismas.

• Funciones alternativas extra-mitocondriales de OPA1

Durante unos años se planteó la posibilidad de la localización de *OPA1* en las gotas lipídicas y de su función como una proteína de anclaje de la A-quinasa que controlaría la lipólisis. Pero esta teoría resultó controvertida y cuestionada por lo que se acabó descartando.

Sin embargo, ya que recientemente se han descrito dos nuevos transcritos de *OPA1* (isoformas 9 y 10), que no tienen la secuencia diana mitocondrial, se plantea la posibilidad de que podrían jugar también un papel en este mecanismo lipídico (figura 2).

• Mutaciones en OPA1

El primer locus identificado para DOA fue en el cromosoma 3q28-q29 por análisis de ligamiento (1994-1998). Más tarde, ya en el año 2000, por clonación posicional, se identificó el gen causante de la enfermedad: *OPA1* (*optic atrophy 1*), ortólogo humano del gen de fisión en levaduras *Msp1*, que codifica para una GTPasa relacionada con la dinamina.

OPA1 es el gen más mutado en la DOA, siendo el responsable del 70% de los casos. De las variantes que se describen como patogénicas, aunque están ampliamente repartidas por toda la secuencia, son muy pocas aquellas variantes relacionadas con los exones que sufren *splicing* alternativo. En cuanto al tipo de mutación:

- 28% son *missense*. La mayoría se agrupan en el dominio GTPasa, que juega un papel fundamental en la homeostasis de la mitocondria. Está descrito que

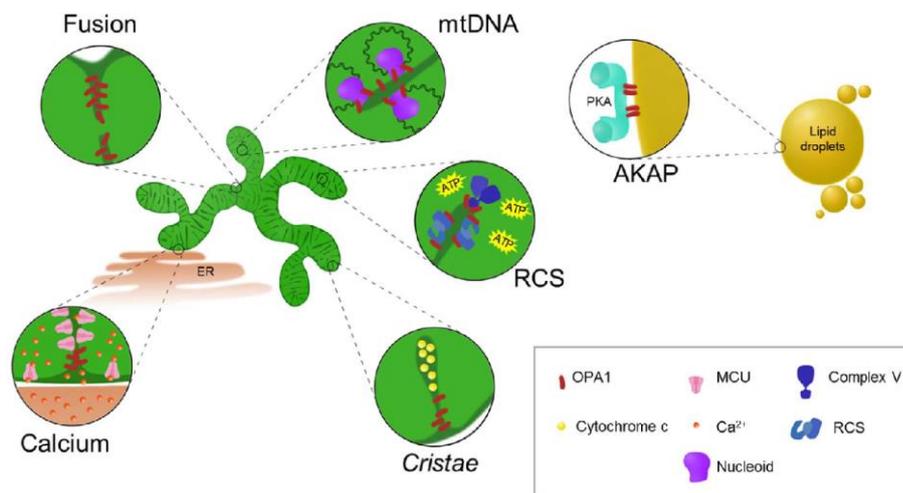


Figura 2. Representación de las funciones mitocondriales y extramitocondriales de la proteína OPA1. Es responsable de la fusión de la membrana mitocondrial interna y con ello del mantenimiento del ADN mitocondrial. Además, participa en la organización de las crestas mitocondriales, manteniendo las uniones, y en el control de la apoptosis, compartimentando el citocromo c. También es esencial para el correcto ensamblaje de los supercomplejos respiratorios (RCS) y de la ATP sintasa (complejo V), y se encuentra vinculada a la homeostasis del calcio en las membranas del retículo endoplasmático (ER) asociadas a la mitocondria. Debido al reciente descubrimiento de un nuevo transcrito del gen *OPA1* que no contiene la región MTS para la importación a la mitocondria, se ha planteado la posibilidad de que OPA1 intervenga en la fisiología del adipocito mediante su acción en la superficie de las gotas lipídicas como proteína de anclaje de la A-quinasa (AKAP). Tomado de: del Dotto V. *et al*, 2018.

mutaciones *missense* localizadas en esta región aumentan potencialmente el riesgo de padecer la forma DOA-plus, por un efecto dominante negativo. Se sugiere que este mecanismo patológico resulta en la inactivación parcial de los homopolímeros de OPA1.

- 24% generan un *splicing* aberrante.
- 22% son *frameshift*. Con desplazamiento del marco de lectura tanto por inserción como por delección de nucleótidos.
- 15% corresponden a mutaciones *nonsense*, generando un codón de terminación prematuro.
- 7% son estructurales.

La mayoría de las variantes causantes de enfermedad llevan a una parada prematura de la traducción, y, por tanto, es probable que generen alelos nulos.

La haploinsuficiencia en *OPA1* parece ser el mecanismo subyacente a la DOA, salvo en mutaciones *missense* localizadas en el dominio GTPasa más propensas a producir enfermedad síndrómica probablemente por un efecto dominante negativo².

● Relación genotipo-fenotipo

Se denomina penetrancia a la probabilidad de que un genotipo específico exprese el fenotipo asociado. Los primeros estudios de mutaciones en el gen *OPA1* mostraban alta penetrancia. Sin embargo, al estudiarse series más largas de pacientes y familias se demostró que podía variar considerablemente su penetrancia, desde un 43 a un 88%. Esto es debido a la variabilidad clínica, entre familias y dentro de las propias familias, con algunos portadores del gen

afectados subclínicamente. Esto obstaculiza la correcta correlación genotipo y fenotipo.

Lo que implica que probablemente aún hay sin definir factores genéticos, epigenéticos y ambientales que puedan modular la expresión fenotípica en DOA. Un ejemplo sería en LHON, donde se ha demostrado que el tabaco es un factor de riesgo en la pérdida de visión, sin embargo en la DOA no se han podido realizar suficientes estudios que demuestren su influencia en la progresión de la enfermedad.

No obstante, como se ha descrito anteriormente sí que se han asociado:

- Algunas mutaciones *missense* a formas multisistémicas más graves (DOA-plus), por un efecto dominante negativo en la proteína. El mayor impacto de la mutación en la función de OPA1 se puede vincular con un aumento de la pérdida de las CGR, y también se relaciona con tasas más rápidas de deterioro visual en DOA-plus frente a DOA1.
- Además, las mutaciones bialélicas se presentan como enfermedad grave síndrómica, como el denominado síndrome de Behr o el síndrome tipo Behr.

● Genes y loci adicionales en DOA

De modo general, está descrito que mutaciones en *OPA1* por defecto causan DOA no síndrómica, y que las formas síndrómicas son debidas a aquellas mutaciones dominantes negativas o bialélicas. Viceversa, la mayoría de los otros genes asociados a DOA se identificaron primero como causantes de enfermedades síndrómicas (mayoritariamente incluyendo la atrofia óptica) y posteriormente se asociaron con atrofia óptica aislada (tabla 1). Estos genes en general

codifican proteínas ligadas a funciones relacionadas con la dinámica mitocondrial.

1. **WFS1 (Wolfram Syndrome 1)**

La glicoproteína Wolframina es abundante en las membranas del retículo endoplasmático (RE) asociadas a mitocondrias, y juega un papel importante en la homeostasis del calcio intracelular. Las mutaciones en *WFS1* pueden originar:

- Síndrome de Wolfram: Desorden neurodegenerativo primario que causa atrofia óptica y diabetes. Frecuentemente también lleva a pérdida de audición, alteraciones renales y enfermedad mental.
- Se han descrito varias familias con:
 - DOA y sordera neurosensorial.
 - Un síndrome tipo Wolfram con expresión variable de la intolerancia a glucosa.
 - Sordera de hereditaria dominante.
 - Atrofia óptica aislada recesiva.

2. **OPA3**

Cuya proteína se localiza en la MMI, con un papel en la organización y forma de la mitocondria, aunque la función exacta se desconoce. Mutaciones en este gen se relacionan con:

- Síndrome Costeff (aciduria 3-metilglutacónica tipo III) que causa atrofia óptica, espasticidad y desórdenes del movimiento.
- DOA y cataratas. Asociadas a mutaciones *missense* monoalélicas heterocigotas.
- Otras mutaciones dominantes en la que la atrofia óptica aparece asociada con otras manifestaciones extraoculares: sordera, neuropatía periférica, ataxia y arreflexia.
- Atrofia óptica aislada.

Aunque se han identificado para DOA otros loci de OPA (*OPA 4*, *OPA 5*, *OPA 8*) mediante análisis de ligamiento, la confirmación de los genes subyacentes aún es desconocida.

3. **AFG3L2 (AFG3 (ATPase Family Gene 3) Like Matrix AAA Peptidase Subunit 2)**

Codifica para una proteasa esencial en el control de calidad de las proteínas mitocondriales. Se encarga de regular a YME1L y OMA1. Mutaciones halladas en este gen se han asociado a:

- Ataxia espinocerebelar tipo 28 (SCA28).
- Ataxia espástica tipo 5.
- DOA asociada a discapacidad intelectual con mutaciones *missense* (c.1402C>T / p.(Arg468Cys)).
- Atrofia óptica aislada.
- DOA asociada a síntomas neurológicos variables, con variantes dominantes y bialélicas.

Todas las variantes *missense* se agrupan en el dominio ATPasa de la proteína, que nunca antes se había encontrado

mutado en pacientes con SCA28. Resulta destacable que en los casos DOA relacionados con *AFGL32* no hay ataxia y que pacientes SCA28 no presentan atrofia óptica. Se concluye que mutaciones en distintos dominios de esta proteína son responsables de dos enfermedades neurológicas sin solapamiento clínico.

4. **SPG7 (Spastic Paraplegia Gen 7)**

Es el ortólogo de *AFG3L2*, también encargado del control de calidad de las proteínas mitocondriales, regulando a YME1L y OMA1. Las mutaciones en el gen pueden causar:

- Paraplejía espástica hereditaria tipo 7 (HSP7), donde también hay rasgos de atrofia óptica.
- DOA sin paraplejía.

5. **DNM1L (Dynamamin 1 Like)**

La proteína tipo dinamina 1 o también denominada proteína relacionada con la dinamina 1 (DRP1), al igual que OPA1, es una GTPasa asociada con la mitocondria. Pero a diferencia de ésta, se encuentra localizada en el citoplasma y posteriormente es reclutada a la membrana mitocondrial externa (MME) como un complejo oligomérico, para ejecutar la constricción y escisión durante la fisión mitocondrial.

Las mutaciones descritas causan:

- Encefalopatía infantil y encefalopatía epiléptica.
- DOA moderado asociado a mutaciones *missense* únicas heterocigotas.

6. **MFN2 (Mitofusina 2)**

Codifica para la proteína Mitofusina-2, que se encuentra anclada a la MME y promueve su fusión. Variantes en *MFN2* se asocian a:

- Neuropatía de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A (CMT2A), donde un 12% presenta atrofia óptica. Además, un porcentaje considerable recupera la visión (frente a otras formas de DOA), hecho que recuerda al curso de pérdida visual y posterior recuperación de los casos de LHON.
- Neuropatía motora y sensorial Hereditaria tipo VI (HMSN VI), con CMT axonal y atrofia óptica.

7. **NR2F1 (Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 1)**

Receptor nuclear huérfano involucrado en la regulación de la transcripción.

Hay descritas tanto mutaciones *missense* localizadas en el dominio de unión al DNA, como deleciones del gen completo. La mayoría ocurren de *novo*.

Causan el síndrome de atrofia óptica de Bosch-Boonstra-Schaaf, que se trata de una condición rara con:

- Pérdida de visión asociada a atrofia óptica, hipoplasia del nervio óptico o deterioro de la visión cortical.
- Retraso en el desarrollo.
- Discapacidad intelectual.

- Otras: hipotonía, disfunción oromotor, desorden del espectro autista y cambios morfológicos en estructuras del cerebro, como el adelgazamiento del cuerpo caloso.

8. **SSBP1 (Single Stranded DNA Binding Protein 1)**

Proteína de unión al ADN monocatenario, requerida para la replicación del ADNmt.

Todas las mutaciones identificadas son sustituciones *missense* que se localizan en el dominio de unión al ADN, lo cual altera la replicación, generando depleción del ADNmt.

- DOA asociada a retinopatía.
- DOA junto con retinopatía, nefropatía y sordera.
- Distrofia retinal, sordera, cardiomiopatía, nefropatía y ataxia.

9. **ACO2 (Aconitase 2)**

Aconitasa mitocondrial que participa en los primeros pasos del ciclo de Krebs, catalizando la isomerización de citrato a isocitrato. Se ha descrito recientemente una mutación dominante que causa DOA, siendo el tercer gen más frecuentemente mutado en pacientes con esta patología.

- **Funciones de los genes adicionales involucrados en DOA**

Un rasgo común de los nuevos genes que han ido emergiendo como causantes de DOA, es que son efectores de la dinámica mitocondrial, a excepción de *SSBP1* (involucrado en la replicación del ADNmt) y *NR2F1* (regulador de la transcripción en el desarrollo cerebral).

1. Genes involucrados en la regulación de la fusión mitocondrial.
 - *MFN2*: actúa en MME en consonancia con *OPA1*.
 - *AFG3L2* y *SPG7*: encargados el proceso de control de calidad de las proteínas mitocondriales. Como se ha descrito anteriormente regulan el corte de *OPA1* a través del procesamiento por *OMA1* e *YME1L*.
2. Genes involucrados en la regulación de la fisión mitocondrial.
 - *OPA3*: probablemente actuando en MMI, aunque su función exacta es aún desconocida.
 - *DNM1L (DRP1)*: situada en la MME.

FISIOPATOLOGÍA EN DOA

- **¿Cuáles son las consecuencias celulares en las CGR?**

La fragmentación mitocondrial tiene implicaciones en el control de calidad mitocondrial y consecuentemente en el contenido mitocondrial a lo largo de los axones de las CGR.

- Se bloquea el intercambio dinámico, tanto de iones como de metabolitos y nucleótidos.
- Se produce interrupción en el potencial de membrana mitocondrial, lo que supone una señal para la degradación mitofágica de las mitocondrias dañadas.

- **¿Por qué degeneran las CGR y el nervio óptico en DOA?**

Las CGR son neuronas, con tres regiones diferenciadas:

- El soma, ubicado en la capa más interna de la retina.
- Las dendritas, que establecen una compleja red de conexiones en la capa plexiforme interna, contactando con las células bipolares y las amacrinas.
- Los axones, que recorren toda la superficie interna de la retina para converger en el disco óptico, atravesando la lámina cribosa (LC) y penetrando en el nervio óptico. A continuación, siguen su ruta a través del quiasma óptico, recorren los tractos ópticos, y finalmente establecen sus sinapsis en el núcleo geniculado lateral.

Fisiológicamente, para evitar la dispersión de la luz y permitir un rendimiento visual óptimo, los axones de las CGR no están mielinizados en el ojo, por lo que se requieren enormes cantidades de energía para restaurar los gradientes de K^+ y Na^+ después de cada potencial de acción. Una vez que pasan la LC, los axones de las CGR se mielinizan y los potenciales de acción se mantienen en un mecanismo de ahorro de energía basado en una propagación saltatoria.

Además, los axones de las CGR son bastante largos, entre 5 y 8 cm en humanos, representando más del 99% del volumen total de las mismas. Independientemente del estímulo visual, descargan unos 15 potenciales de acción por segundo, lo que obliga a unas necesidades energéticas elevadas que repercute en las mitocondrias.

Se han llevado a cabo diversos estudios en CGR de ratones, para conocer tanto la distribución como la forma de las mitocondrias en esta región.

Utilizando anticuerpos marcados con fluorocromos se observa una distribución desigual de las mitocondrias (figura 3), donde la transición de la abundancia mitocondrial ocurre en la LC, correlacionando con el estado de mielinización.

- Concentración mitocondrial densa en las regiones desmielinizadas del axón, que además en ocasiones forman varicosidades que acumulan mitocondrias.
- Distribución más difusa en las partes mielinizadas.

Otros estudios utilizando microscopía electrónica demuestran la presencia de (figura 4):

- Mitocondrias redondeadas con un contenido de la matriz más claro en las regiones desmielinizadas del axón.
- Mitocondrias alargadas con un contenido de la matriz más oscuro en las regiones mielinizadas.

Además, en la región de la LC, donde coexisten axones con y sin mielina, se observa que según el estado de mielinización del axón donde se encuentran las mitocondrias, éstas presentan diferentes dinámicas:

- Las redondeadas se van asociando para llevar a cabo la fusión.
- Las oscuras de forma alargada son propensas a la división (fisión).

GEN	LOCUS	FUNCIÓN	OMIM	HERENCIA	FENOTIPO
OPA1	3q28-q29	Fusión mitocondrial	605290	AR	Síndrome de Behr
				AD	DOA
				AD	DOA-plus
OPA3	19q13.2-q13.3	Forma mitocondrial Control apoptótico	606580	AR	Síndrome de Costeff
				AD	DOA y cataratas
AFG3L2	18p11.21	Control de calidad mitocondrial	604581	AD	Ataxia espinocerebelar tipo 28 (SCA28)
				AR	Ataxia espástica tipo 5
				AD	DOA
SPG7	16q24.3	Control de calidad mitocondrial	602783	AR/AD	Paraplejía espástica hereditaria tipo 7 (HSP7)
				AD	DOA
DNM1L	12p11.21	Fisión mitocondrial	603850	AD/AR	Encefalopatía infantil Encefalopatía epiléptica
				AD	DOA
MFN2	1p36.22	Fusión mitocondrial	608507	AD/AR	Neuropatía de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A (CMT2A)
				AD	Neuropatía motora y sensorial Hereditaria tipo VI (HMSN VI)
NR2F1	5q15	Regulación de la transcripción	132890	AD	Síndrome de atrofia óptica de Bosch- Boonstra-Schaaf
WFS1	4p16.1	Interacciones RE- mitocondria y homeostasis del calcio intracelular	606201	AR	Síndrome de Wolfram
				AD	DOA y sordera
SSBP1	7q34	Replicación ADN mitocondrial	600439	AD	DOA y retinopatía
				AD	DOA, retinopatía, nefropatía y sordera
				AR	Distrofia retinal, sordera, cardiomiopatía, nefropatía y ataxia

Tabla 1. Descripción de *OPA1* y otros genes causantes de atrofia óptica dominante. AD: autosómico dominante; AR: autosómico recesivo; RE: Retículo endoplasmático. Adaptado de: Lenaers G. *et al*, 2020.

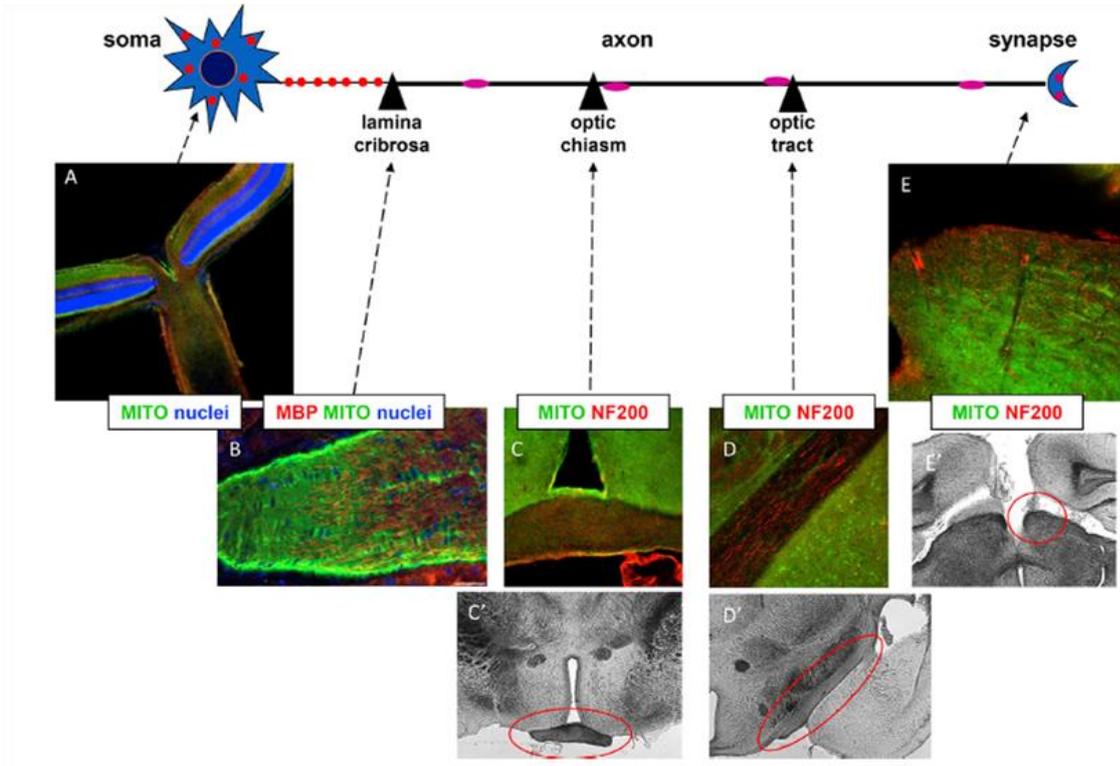


Figura 3. Estudios con microscopía de fluorescencia usando anticuerpos marcados (verde: mitocondrias; rojo: nervio óptico, siendo MBP-mielina y NF200-axones; azul: núcleo) que muestran distribución desigual de las mitocondrias a lo largo del axón de las células ganglionares de la retina. A: Sección de la retina donde emerge el nervio óptico con abundancia mitocondrial (verde). B: Gran concentración mitocondrial en el segmento desmielinizado, y que se va reduciendo conforme aparece la mielina (rojo). C, C' y D, D': El contenido mitocondrial permanece bajo desde el quiasma a tractos ópticos, frente al tejido de alrededor. E y E': núcleo geniculado lateral donde se producen las sinapsis. Tomado de: Lenaers G. *et al*, 2020.

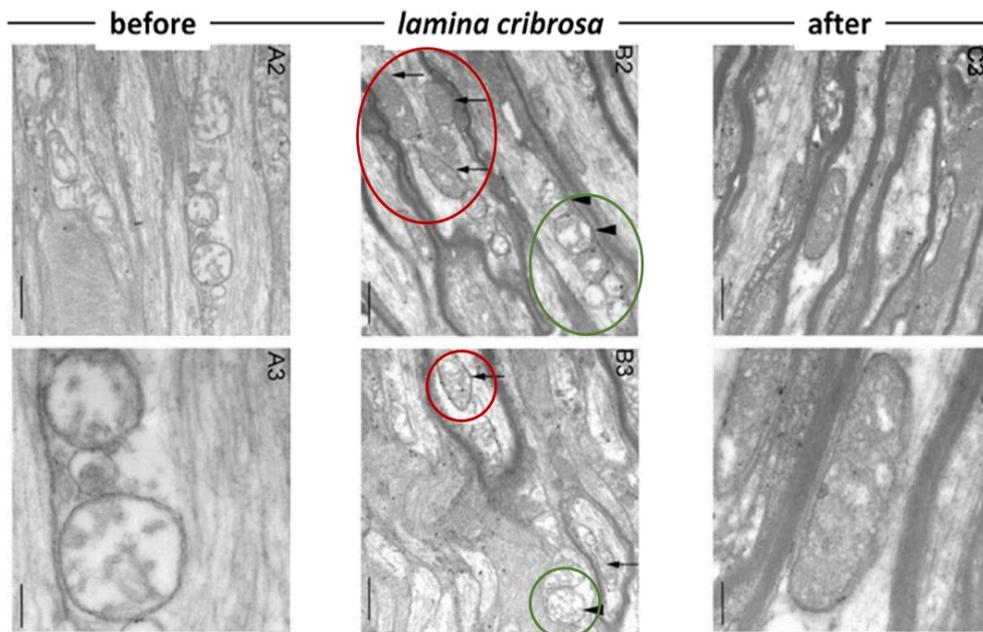


Figura 4. Microscopía electrónica del nervio óptico de ratones mostrando cambios en la densidad y morfología mitocondriales en relación al grado de mielinización. Izquierda: Mitocondrias redondeadas con un contenido matricial más claro en las regiones desmielinizadas. Derecha: Mitocondrias más alargadas con un contenido de la matriz oscuro en las regiones mielinizadas. Centro: en la lámina cribrosa, donde coexisten axones con y sin mielina, las mitocondrias evolucionan de redondeadas (círculo verde) a alargadas (círculo rojo). Adaptado de: Lenaers G. *et al*, 2020.

Estas observaciones enfatizan las grandes modificaciones en la dinámica de la membrana que ocurren durante el transporte axonal en esta región de transición, que involucra modificaciones tanto intra como intermitocondriales. Destacando así las funciones básicas de OPA1.

Sin embargo, como se ha comentado, los estudios se han realizado en ratones, por tanto, se debería confirmar si estas particularidades se conservan en humanos, ya que la LC de los ratones presenta distinta organización y estructura.

- **¿Por qué las CGR que forman el haz papilomacular degeneran en la DOA?**

La pérdida de campo visual y las imágenes OCT de la capa de fibras nerviosas de la retina en pacientes con DOA muestran que la pérdida de CGR no es uniforme. Preferiblemente afecta a las células ganglionares pequeñas parvocelulares del centro de la retina.

Lenaers *et al* proponen tres hipótesis, que aunque ninguna ha sido comprobada experimentalmente hoy en día, debido a la falta de modelos animales relevantes que reproduzcan el escotoma central, cada una de ellas por sí sola, o sus combinaciones podrían contribuir al patrón altamente específico de degeneración de las CGR en la zona central de la retina.

- El combustible: es muy importante en la región macular, donde la red vascular de la retina interna se va viendo restringida conforme converge hacia la fóvea. La angiografía mediante OCT en pacientes DOA revela una alteración de la red vascular en el haz papilomacular de la retina. Esto puede interferir con la disponibilidad de carbohidratos y oxígeno para alimentar las mitocondrias de las CGR, que por otro lado ya tienen comprometida su eficiencia para producir ATP debido a la mutación en OPA1.
- La permanente exposición de la retina central al estrés oxidativo generado por la luz que se propaga a través del ojo. Está demostrado que las longitudes de onda cortas (400-480nm) causan un estrés característico en las CGR, poniendo en peligro tanto la eficiencia como la supervivencia mitocondrial. Así, la combinación de los defectos mitocondriales relacionados con mutaciones en OPA1 (que asocian una menor producción de energía a un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno), junto con los daños inducidos por la exposición a la luz, podrían contribuir a una mayor degeneración de las CG de en la retina central.
- Las CGR que preferentemente se degeneran tanto en DOA como en LHON son las pequeñas parvocelulares, que presentan un diámetro axonal inferior a 1µm. Estas transducen la información visual a una tasa inferior que la magnocelulares. Las células magnocelulares son aquellas situadas en la periferia y con un diámetro axonal mayor. Esto podría correlacionar con un menor requerimiento energético en las células parvocelulares. Sin embargo, el diámetro tan pequeño hace que se afecte el transporte mitocondrial, ya que no pueden alojar más de una mitocondria por sección transversal. Imponiéndose así

restricciones específicas en la forma de la red mitocondrial durante el transporte axonal.

CASO CLÍNICO

Se trata de un varón de 6 años que acude al servicio de oftalmología pediátrica por visión borrosa. Durante su seguimiento se observa pérdida de visión, palidez de nervios ópticos y posible disminución de la capa de fibras nerviosas papilares y perimaculares. Estudios adicionales muestran pérdida de campo visual (escotomas) sin discromatopsia. Se diagnostica como neuropatía óptica bilateral a filiar, para lo que se solicita estudio genético.

Se realiza un panel virtual de 53 genes asociados atrofia óptica mediante secuenciación de exoma completo, y se halla la presencia de una variante en OPA1: NM_130837.2: c.2013G>A; p.(Trp671*). Esta variante conduce *a priori* a la aparición de un codón de parada prematuro en el exón 22, que predice la síntesis de una proteína truncada. Además se localiza en la posición +1 del exón 22, en la región de unión exón-intrón por lo que podría alterar el proceso de *splicing*.

Sin más patología que la ocular, se diagnostica de DOA1 o tipo Kjer. Además, se solicita la segregación de la variante en progenitores, para establecer el modo de herencia o posible aparición *de novo*, de la variante con el fin realizar un adecuado consejo genético.

El estudio de segregación en progenitores mediante secuenciación directa Sanger (figura 5), sugiere una posible penetrancia incompleta, dado que la variante estaba presente en el padre (46 años) sin antecedentes de patología ocular. Además, el probando tiene una hermana menor que no fue incluida en el estudio la cuál tampoco presentaba hasta la fecha sintomatología ocular.

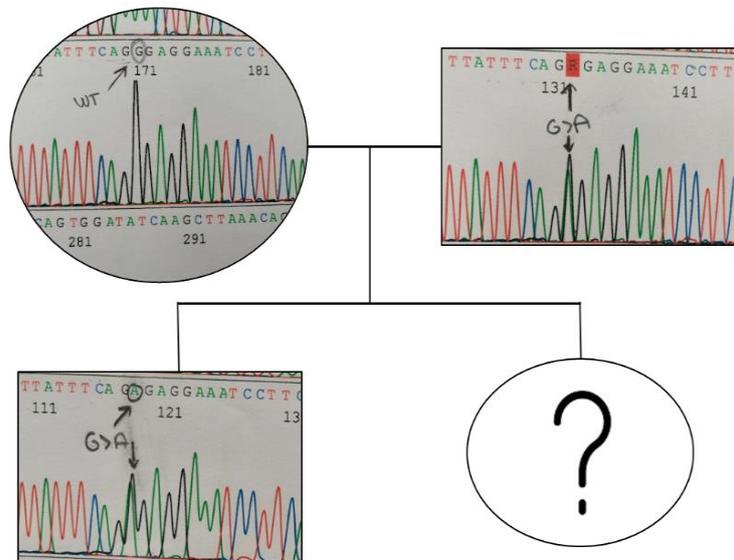


Figura 5. Estudio de segregación familiar en los progenitores del probando con la variante en *OPA1* (NM_130837.2): c.2013G>A; p(Trp671*) mediante secuenciación directa Sanger. Se confirma la variante hallada durante el estudio del exoma en el probando y además se tipifica el origen paterno de la misma. El padre no tenía antecedentes de clínica ocular hasta la fecha. La hermana menor del probando no fue incluida en el estudio y no presenta por el momento patología ocular. Elaboración propia.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

- Blázquez Encinar A., Rocha H. Enfermedades mitocondriales con origen en el ADN mitocondrial Ed. Cont Lab Clin. 2020;52:1-12
- Del Dotto V, Fogazza M, Carelli V, Rugolo M, Zanna C. Eight human *OPA1* isoforms, long and short: What are they for? *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2018;1859(4):263-69. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.01.005>

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Almind GJ, Grønskov K, Milea D, Larsen M, Brøndum-Nielsen K, Ek J. Genomic deletions in *OPA1* in Danish patients with autosomal dominant optic atrophy. *BMC Med Genet.* 2011;12(49). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-49>
- Lenaers G, Neutzner A, Le Dantec Y, Jüschke C, Xiao T, Decembrini S, et al. Dominant Optic Atrophy: Culprit Mitochondria in the Optic Nerve. *Prog Retin Eye Res.* 2020;83:100935. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100935>

BLOQUE IV

SESIONES DE HEMATOLOGÍA

ESTUDIO DE ALTERACIONES DE LA SERIE MIELOIDE: NEUTROPENIAS Y NEOPLASIAS MIELOIDES

Autores: Laura Carrasco Parrón; Sandra Gómez Rojas

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

Palabras clave: Hemograma, Neutropenia, Leucemia mieloide

INTRODUCCIÓN

Las células sanguíneas se originan en la médula ósea. Proviene de una célula progenitora común que se denomina célula madre hematopoyética o *stem cell*, cuya diferenciación dará lugar a los precursores de las tres series hematopoyéticas que circulan en sangre periférica: eritroide, granulopoyética y megacariocítica. Las células madre germinales pluripotenciales tienen capacidad de autorrenovación, proliferación y diferenciación (Figura 1).

Las células hematopoyéticas pasan a la **circulación** y es en el árbol vascular o los tejidos donde completan su maduración. El mantenimiento de las cifras normales de elementos sanguíneos requiere un balance equilibrado entre su proliferación, diferenciación y destrucción.

Todos los elementos de la serie granulocítica muestran actividad mieloperoxidásica, que se pone de manifiesto mediante la reacción citoquímica de las mieloperoxidasas. Las etapas de diferenciación de la serie granulocítica son las siguientes:

- Mieloblasto. Es el elemento más inmaduro y no suele verse en sangre periférica de individuos sanos.
- Promielocito. Tampoco suele observarse en la sangre periférica de individuos sanos. Suele presentar un núcleo excéntrico y la cromatina es laxa, con nucleolo visible.
- Mielocito. Su núcleo es redondo, usualmente excéntrico y con cromatina condensada.
- Metamielocito. Similar al mielocito, pero con perfil indentado.
- Neutrófilos no segmentados o en cayado o bandas. Su núcleo aún no ha alcanzado la segmentación.

En cuanto a las etapas de diferenciación de la serie monocítica encontramos:

- Monoblasto. Presenta núcleo de perfil redondeado de cromatina laxa e inmadura.
- Promonocito. Tiene un núcleo de perfil más redondeado que los monocitos, o ligeramente indentado. Puede

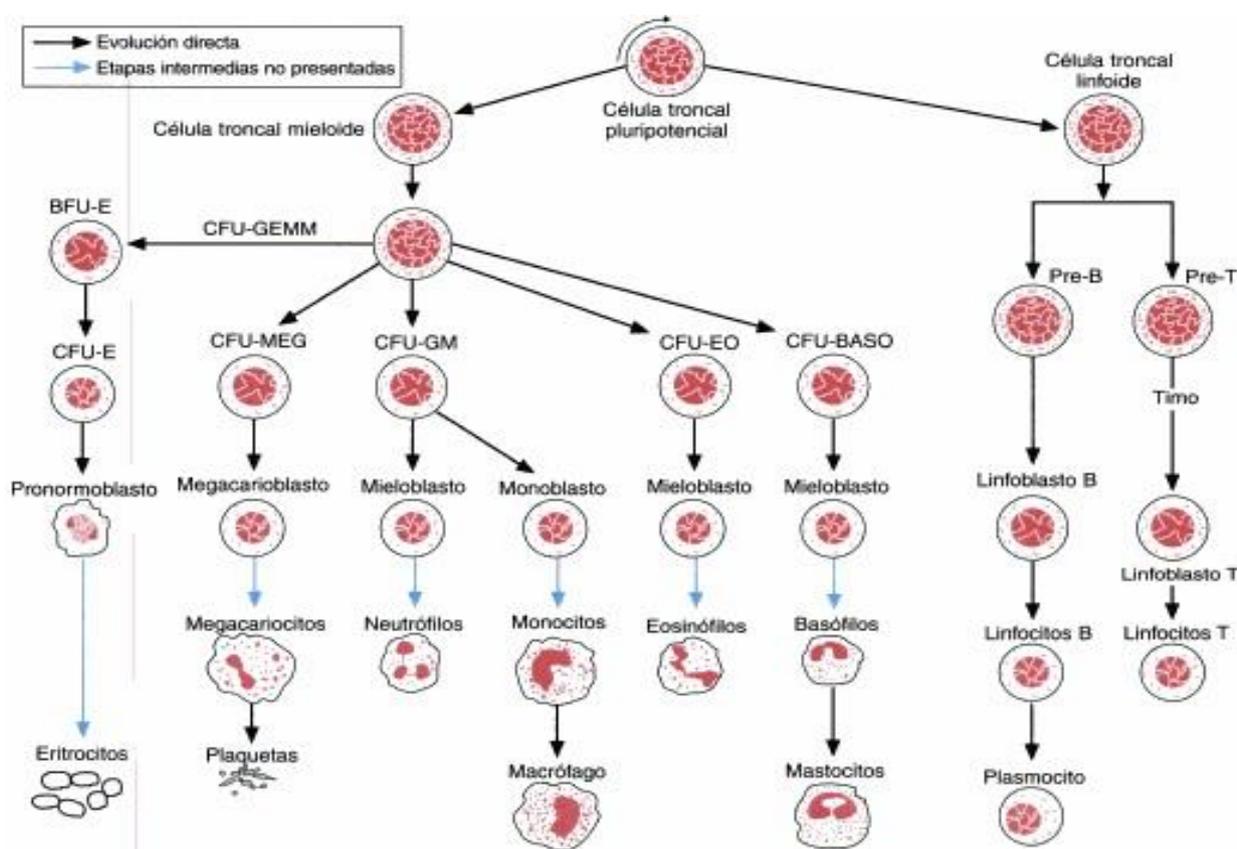


Figura 1. Hematopoyesis. Tomado de: Rodak B, Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas, 2004.

mostrar uno o varios nucleolos. El citoplasma es ligeramente más basófilo.

• Leucocitos

Los leucocitos proceden, como ya hemos mencionado, de las células madre pluripotenciales que, por efecto de determinadas citocinas o factores estimuladores y tras sucesivas divisiones y maduración de los precursores granulocíticos en la médula ósea, dan lugar a los elementos maduros que se hallan en sangre periférica. Los leucocitos se dividen en granulocitos o polimorfonucleares y células mononucleadas (Figura 2).

- **Granulocitos maduros o polimorfonucleares.** Presentan los siguientes marcadores granulocíticos: CD13, CD33, CD15, CD65, MPO.

1. **Neutrófilos segmentados y no segmentados.** Los neutrófilos representan el 54-62% de los leucocitos de sangre periférica. Después pasan de los capilares a los tejidos, donde su función principal es la fagocitosis. Su núcleo se halla dividido en de 2 a 5 segmentos o lóbulos unidos por un fino filamento de material nuclear. El citoplasma es de color rosa pálido y contiene gránulos que se denominan neutrofilicos por su color violáceo, debido a que captan los componentes tanto ácidos como básicos de la tinción.

- Neutrófilos segmentados. Hablamos de neutrófilos segmentados cuando presentan apéndices nucleares en palillo de tambor (corpúsculo de Barr), que corresponden a los cromosomas sexuales femeninos y están situados en uno de los extremos del núcleo.

- Neutrófilos no segmentados. También denominados neutrófilos en cayado o bandas y reciben este nombre cuando su núcleo no está segmentado. Suelen considerarse valores normales de granulocitos neutrófilos en cayado o bandas cuando corresponden a un 0-6% de los leucocitos totales de sangre periférica. El aumento de estas formas más jóvenes de neutrófilos en sangre periférica se denomina desviación a la izquierda y generalmente se asocia a procesos inflamatorios o infecciones agudas.

2. **Eosinófilos.** Constituyen un 1-3% de los leucocitos de sangre. Los eosinófilos fagocitan microorganismos, desempeñan un papel relevante en la defensa contra algunos parásitos y también están implicados en las reacciones alérgicas. Su núcleo suele mostrar un menor grado de segmentación y acostumbra a ser bilobulado.

3. **Basófilos.** Circulan en sangre periférica en pequeño número (0-1%) y después migran a los tejidos. Están implicados en respuestas inflamatorias y alérgicas. Su núcleo presenta de 0 a 4 lóbulos y su característica más notable es que contienen una granulación basófila que

se tiñe de color púrpura intenso porque captan los componentes básicos de la tinción. La basofilia se asocia muy a menudo con la existencia de una neoplasia mieloproliferativa en especial la leucemia mieloide crónica.

- **Células mononucleadas.** Presentan los siguientes marcadores monocíticos: CD14, CD4, CD11b, CD64, CD36, lisozima.

1. **Linfocitos.** Son los leucocitos más numerosos en sangre periférica después de los neutrófilos, constituyendo un 25-33% de los leucocitos totales. Circulan en sangre periférica y, posteriormente, se dirigen a los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo, amígdalas y otros tejidos linfoides asociados a piel y mucosas). Su núcleo es redondeado y el citoplasma es ligeramente basófilo, en ocasiones con granulación azurófila, que contiene enzimas lisosómicas. Los linfocitos se dividen en diferentes tipos funcionales, principalmente T, B y *natural killer* (NK).

2. **Monocitos.** Representan un 3-10% de los leucocitos totales de sangre periférica y presentan un núcleo con forma arriñonada y el citoplasma amplio de color azul-grisáceo con granulación azurófila. Los monocitos realizan su función principalmente en el ámbito de los tejidos, donde se diferencian a macrófagos y defienden al organismo de infecciones bacterianas o fúngicas y también fagocitan restos celulares. Los monocitos expresan débilmente el antígeno CD14, así como otros antígenos mieloides como CD13 y CD33.

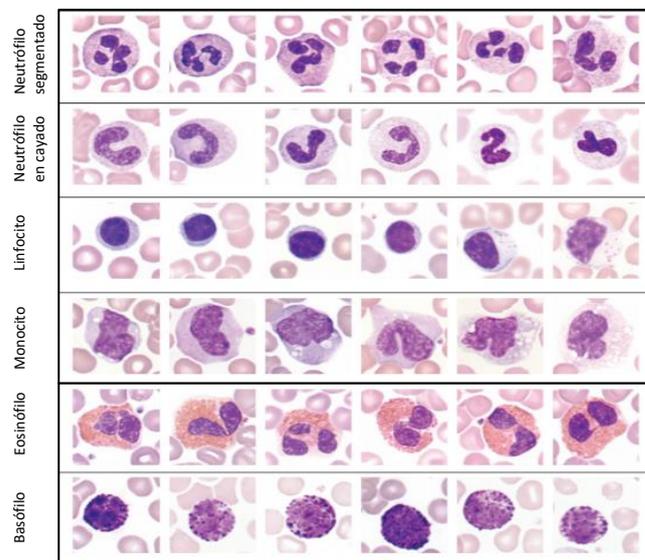


Figura 2. Características morfológicas de los leucocitos. Adaptado de: Rodak B, Atlas de Hematología Clínica, 2014.

LA IMPORTANCIA DEL HEMOGRAMA

La fórmula leucocitaria se define como el recuento porcentual de las diferentes subpoblaciones leucocitarias. El hemograma incluye la fórmula leucocitaria y la determinación de otras magnitudes celulares sanguíneas, como el recuento

de leucocitos, hematíes y plaquetas, la concentración de hemoglobina, hematocrito y volumen medio de los hematíes, entre otras. La determinación de los parámetros hematológicos básicos mediante contadores hematológicos especializados, junto al examen morfológico de los elementos sanguíneos en sangre periférica, son de gran utilidad para la detección de alteraciones cuantitativas y cualitativas de estas células sanguíneas, lo que contribuye al diagnóstico de enfermedades hematológicas y no hematológicas (Tabla 1).

	Varones	Mujeres
Hematíes (x10¹²/L)	4,32-5,66	3,88-4,99
Leucocitos (x10⁹/L)	3,7-9,5	3,9-11,1
Plaquetas (x10⁹/L)	143-332	169-358

Tabla 2. Valores normales de los recuentos de células sanguíneas en adultos. Elaboración propia.

Se considera leucocitosis cuando la cifra de leucocitos es superior a 20x10⁹/L. Las causas pueden ser:

- Reacción leucemoide: derivada de infecciones graves, neoplasias o anemias hemolíticas. La leucocitosis se acompaña de un aumento en los neutrófilos y desviación a la izquierda o mielema. No se observan translocaciones.
- Síndromes mieloproliferativos crónicos: como leucemia mieloide crónica (LMC).
- Leucemias agudas: la leucocitosis suele acompañarse de plaquetopenia y/o anemia.

El hallazgo de leucopenia o disminución de leucocitos, cuando es secundaria a una insuficiencia medular grave o aplasia, se acompaña además de anemia y plaquetopenia. La insuficiencia medular puede ser idiopática o secundaria (leucemia, neoplasia).

ESTUDIO DE NEUTROPENIAS

La neutropenia se define como un descenso en el número absoluto de neutrófilos segmentados y cayados circulantes en la sangre periférica. El recuento absoluto de neutrófilos (RAN) se determina multiplicando el recuento total de leucocitos por el porcentaje de neutrófilos segmentados y cayados.

Los neutrófilos predominan en el nacimiento, pero descienden rápidamente en los primeros días de vida. Durante la lactancia, los neutrófilos constituyen el 20-30% de la población de leucocitos circulantes. Casi se encuentra un número igual de neutrófilos y de linfocitos en la circulación periférica a los 5 años de edad, y el predominio característico del 70% de neutrófilos de los adultos suele alcanzarse durante la pubertad.

La neutropenia puede caracterizarse como leve (RAN de 1.000-1.500/ μ l), moderada (RAN de 500-1.000/ μ l) o acentuada (RAN de menos de 500 μ l). El RAN menor de 200 también se denomina agranulocitosis.

• Manifestaciones clínicas de las neutropenias

Los sujetos con recuentos de neutrófilos menores de 500/ μ l tienen un riesgo importante de sufrir infecciones, sobre todo por flora endógena, así como por microorganismos nosocomiales.

Los microorganismos patógenos que con mayor frecuencia producen infecciones en el paciente neutropénico son *Staphylococcus aureus* y las bacterias gram negativas. La neutropenia aislada no potencia la predisposición del paciente a las infecciones parasitarias ni víricas ni a la meningitis bacteriana, pero aumenta el riesgo de que los patógenos fúngicos causen enfermedades.

La presentación clínica de la neutropenia profunda más frecuente abarca la fiebre, la estomatitis aftosa y la gingivitis. Los signos y síntomas habituales de la infección local y la inflamación pueden estar reducidos sin los neutrófilos debido a la incapacidad para formar pus.

• Tipos de neutropenia

Existen varias formas de clasificar las neutropenias: aguda o crónica, congénita o adquirida, o en función de la etiología.

- **Neutropenia aguda.** Evoluciona en unos pocos días y se debe a menudo al uso de neutrófilos o a su producción reducida.
- **Neutropenia crónica.** Dura por definición más de 3 meses y se debe a una producción reducida, una destrucción aumentada o un secuestro esplénico excesivo de neutrófilos.

• Causas primarias de neutropenia (congénitas).

- **Neutropenia étnica y familiar benigna (constitucional).** El rango normal del recuento de neutrófilos está determinado genéticamente y puede ser variable. Esto se denomina "neutropenia constitucional" y se observa en varios grupos étnicos. Se ha demostrado que los polimorfismos en el gen del receptor del antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) se asocian con la raza y se han propuesto como candidatos para explicar las diferencias raciales y étnicas del recuento de neutrófilos.

También hay una enfermedad hereditaria autosómica dominante, denominada "neutropenia familiar benigna", que se caracteriza por un recuento de neutrófilos en el rango de 800-1.400/ μ L. Se ha demostrado que la neutropenia tanto étnica como familiar benigna no se asocian con un mayor riesgo de infección.

- **Neutropenia congénita grave (NCG).** Consiste en una neutropenia grave con recuentos de neutrófilos menores de 500/ μ l, que debuta en el período neonatal con infecciones bacterianas recidivantes. Suele haber un aumento de otras estirpes de células mieloides, como monocitos y eosinófilos. Se ha demostrado que se asocia con mutaciones de varios genes.

La elastasa de neutrófilos (ELA2, ahora denominada ELANE) es una serina proteasa que se sintetiza en niveles elevados en la etapa de maduración del promielocito de los neutrófilos y se empaqueta en gránulos primarios. La evidencia más reciente respalda

- un mecanismo por el cual la acumulación de la elastasa de neutrófilos mutante en el retículo endoplásmico activa la respuesta de proteína no plegada, lo que causa la apoptosis. Debido a estas mutaciones, la NCG se hereda de forma autosómica dominante. Hay otras causas de NCG como Hax-1, una proteína mitocondrial cuya ausencia provoca apoptosis dependiente de mitocondrias o las mutaciones en la subunidad catalítica 3 de la glucosa-6-fosfatasa (G6PC3). También se han descrito mutaciones en el receptor de G-CSF asociadas con NCG.
- **Neutropenia cíclica.** La neutropenia cíclica se define como períodos de neutropenia ($\leq 200/\mu\text{L}$) de 3-5 días de duración que aparecen a intervalos de unos 21 días. Estos períodos de neutropenia pueden caracterizarse por fiebre recurrente, úlceras bucales e infecciones cutáneas, respiratorias y del oído. El trastorno puede heredarse de forma dominante o ser esporádico. Se ha demostrado que la neutropenia cíclica congénita también se asocia con mutaciones del gen de la elastasa de neutrófilos en prácticamente todos los casos analizados hasta la fecha. Se puede diagnosticar mediante la secuenciación del gen de la elastasa de neutrófilos.
 - **Otros síndromes congénitos con neutropenia asociada.** Algunos síndromes congénitos presentan neutropenia como una de las anomalías que componen su cuadro sindrómico. Entre ellos, hay que citar:
 - Síndrome de Shwachman-Diamond.
 - Anemia de Fanconi. Se debe a mutaciones de genes implicados en la reparación del ADN.
 - Disqueratosis congénita (DQC). Puede heredarse de forma autosómica dominante o recesiva o ligada al cromosoma X, y se ha demostrado que se asocia con mutaciones en varios genes que intervienen en el mantenimiento de los telómeros.
 - Glucogenosis Ib. Se hereda de forma autosómica recesiva y se caracteriza por neutropenia intermitente debida a defectos del estallido respiratorio de los neutrófilos, con la subsiguiente apoptosis.
 - Mielocatexis. En este caso la neutropenia se debe a la retención de los neutrófilos maduros en la médula ósea a pesar de que su recuento en sangre periférica es bajo. Sin embargo, durante la infección, los pacientes con mielocatexis suelen tener un aumento repentino de su recuento de neutrófilos, por lo que su evolución clínica es relativamente más benigna. Se ha demostrado que se debe a mutaciones heterocigotas del gen que codifica el receptor de quimiocinas CXCR4.
 - Los síndromes de Chédiak-Higashi, de Griscelli de tipo II y de Hermansky-Pudlak de tipo II presentan albinismo y neutropenia por defectos del transporte de vesículas.
 - Síndrome de Barth. Es un trastorno recesivo ligado al X caracterizado por neutropenia, miocardiopatía y retraso del crecimiento con una mortalidad elevada durante toda la infancia por cardiopatía.
- **Causas secundarias de neutropenia (adquiridas)**
 - **Neutropenia relacionada con infecciones.** Se ha demostrado que varias infecciones virales causan una neutropenia transitoria que se suele resolver a medida que disminuye la viremia. Entre ellas, hay que citar la varicela, el sarampión, la rubéola, la hepatitis A y B, el virus de Epstein-Barr, la gripe, el parvovirus y el citomegalovirus. Los mecanismos son diversos y pueden implicar la redistribución, la disminución de la producción y la destrucción inmunitaria de los neutrófilos.
 - **Neutropenia inducida por fármacos y neutropenias por lesión de la médula ósea.** Es la causa más común de neutropenia. Las neutropenias inducidas por fármacos pueden reflejar una supresión de la granulocitopoyesis medular o un aumento de la destrucción o eliminación de los neutrófilos periféricos. El patrón típico de neutropenia inducida por fármacos es una reducción marcada del recuento de neutrófilos, que ocurre aproximadamente 1-2 semanas después de la exposición al fármaco y que se empieza a recuperar a los pocos días de suspenderlo. Algunos fármacos que son una causa conocida de neutropenia, además de los antineoplásicos, los antivirales y los inmunosupresores, son la clozapina, el metamizol, la quinidina o la procainamida.
 - **Neutropenia inmunitaria.** Puede ocurrir como un fenómeno aislado (neutropenia inmunitaria primaria) o como una manifestación de una enfermedad autoinmunitaria sistémica subyacente (neutropenia inmunitaria secundaria). Casi todos estos pacientes tienen anticuerpos antineutrófilos; estos anticuerpos median la destrucción de neutrófilos por secuestro en el bazo o por lisis mediada por complemento.
 - **Neutropenia por aumento de la marginación e hiperesplenismo.** La activación del complemento puede causar neutropenia tanto aguda como crónica. Esto se atribuye al hecho de que el C5a aumenta la adhesividad de los neutrófilos, por lo que se vuelven propensos a la agregación dentro de la vasculatura esplénica.
 - **Neutropenia por deficiencia nutricional.** Varias deficiencias de vitaminas y minerales, en especial B12, folato y cobre, se asocian con neutropenia.
 - **Neutropenia idiopática crónica.** La neutropenia crónica idiopática de adultos (NCIA) se ha descrito como un trastorno adquirido de la granulocitopoyesis caracterizado por una neutropenia prolongada sin una etiología de base aparente.

ESTUDIO DE NEOPLASIAS MIELOIDES

Las leucemias no tienen elevada incidencia pero son de especial interés debido a la notable aparición en pacientes

pediátricos y adultos jóvenes. En cuanto a la etiología, pueden ser el resultado de:

- Exposición a agentes externos: radiaciones ionizantes, radioterapia, sustancias químicas, benceno. Virus como HTLV-1, VEB, VIH.
- Constitucionales: inmunodeficiencias (agammaglobulinemia congénita), anemia de Fanconi, síndrome de Down.
- Alteraciones genéticas: alteraciones cromosómicas y anomalías oncogénicas.

Los síntomas más comunes de la leucemia son pérdida de peso, fiebre, infecciones frecuentes, fatiga mental, pérdida de apetito, inflamación de los ganglios, disnea, hepato y esplenomegalia, debilidad muscular y fragilidad ósea.

Las leucemias no tienen una presentación común ni un patrón de repetición, hay que pensar en ellas ante cualquier alteración del hemograma grave y/o aguda. Se debe hacer siempre frotis de sangre periférica y buscar células inmaduras junto con otros datos citológicos que nos orienten hacia una hemopatía aguda.

Hasta ahora, la clasificación de leucemias se basaba en la morfología de sangre periférica vista al microscopio y esto se ha utilizado para el diagnóstico y tratamiento de las mismas. Actualmente, se consideran otros métodos de diagnóstico y tratamiento, que se añaden a la morfología de sangre periférica para una mejor caracterización diagnóstica y un tratamiento más específico.

- **Inmunofenotipo:** Se realiza sobre muestras de sangre periférica y/o médula ósea. Se analizan las líneas celulares y su clonalidad mediante citometría de flujo. Las células se clasifican en base a su tamaño, complejidad y múltiples marcadores en forma de anticuerpos monoclonales y policlonales específicos. El estudio de múltiples marcadores de manera simultánea lleva a conocer cada tipo celular específico implicado en la proliferación clonal, así como el estadio madurativo de dichas células. La caracterización del linaje de las células neoplásicas empieza por distinguir el origen mielóide o linfóide de las mismas, y dentro de las de estirpe linfóide entre linfocitos T y B.
- **Pruebas genéticas:**
 - Citogenéticas. Por ejemplo, realización del cariotipo y FISH (hibridación in situ fluorescente). Mediante dichas pruebas se pueden detectar alteraciones numéricas y

estructurales, como trisomías, deleciones, duplicaciones o reordenamientos cromosómicos, entre otros.

- Moleculares. Por ejemplo, distintos tipos de PCR, para detectar y/o cuantificar mutaciones concretas, o NGS o secuenciación masiva, que permite analizar un gran número de genes en una sola prueba.

Actualmente, de hecho, es imprescindible realizar tanto la morfología de sangre periférica como el inmunofenotipo y la genética, todo esto junto con la clínica, hará que el hematólogo la clasifique y le ponga el tratamiento.

Entrando en el estudio de las neoplasias mieloides, encontramos:

• Síndromes mielodisplásicos

Los síndromes mielodisplásicos constituyen un conjunto de alteraciones morfológicas, inmunofenotípicas, funcionales y genómicas que tienen lugar en las diferentes líneas de la hematopoyesis, desde las células madre hasta los elementos más maduros. Todos ellos tienen en común cierto riesgo de transformación a leucemia aguda mielóide (30% de los casos).

Se observan en pacientes a partir de los 50 años y la evolución clínica es variable. Se caracterizan por anomalías tanto cualitativas como cuantitativas de las distintas líneas hematopoyéticas en sangre periférica y médula ósea. Se deben a una alteración de la capacidad de proliferación y diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas, junto con un aumento de la apoptosis o muerte celular programada.

La mielopoyesis ineficaz se traduce en la coexistencia de citopenias (anemia, leucopenia y trombocitopenia) junto con una médula ósea normal o hiperclular.

En sangre periférica se aprecia citopenia de una línea, bicitopenia o pancitopenia, siendo la anemia el hallazgo más común. Además, la sideremia está aumentada, así como la ferritina sérica e intraeritrocitaria. Respecto a los parámetros bioquímicos, es frecuente encontrar hiperbilirrubinemia, hiperuricemia y aumento de LDH.

Los signos mielodisplásicos en la serie granulocítica son (Figura 3):

- Presencia de pseudo-Pelger-Huët. Los neutrófilos pueden mostrar deficiencia en la segmentación nuclear, con núcleos mayoritariamente bisegmentados o ausencia de segmentación.
- Cuerpos de Döhle. Son inclusiones en el citoplasma de los neutrófilos, con un color basófilo por la acumulación anormal de ribosomas.

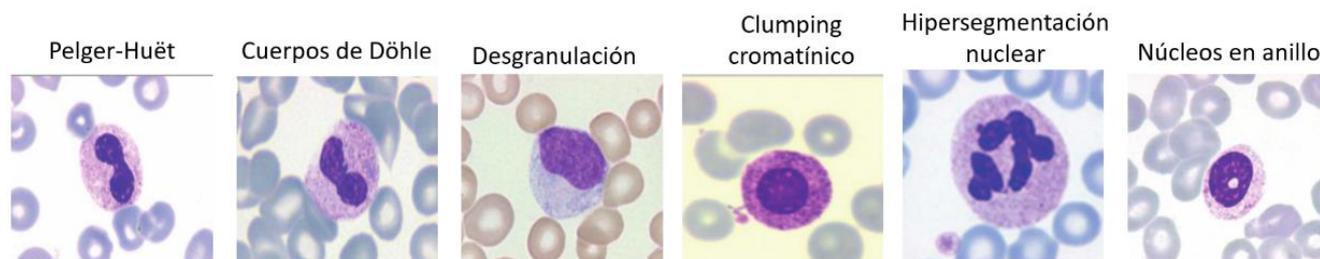


Figura 3. Principales signos mielodisplásicos. Adaptado de: Merino A, 2020.

- Clumping o condensación cromatínica muy intensa por zonas.
- Desgranulación de los elementos granulocíticos. La desgranulación de la serie blanca, junto con la presencia de hipobulacion del núcleo, constituyen una anomalía muy característica de los síndromes mielodisplásicos.
- Hipersegmentación nuclear.
- Presencia de núcleos en anillo.
- Dismorfias de la granulación como marcada granulación primaria o granulación gigante de tipo Chédiak-Higashi.
- Mielocatexis adquirida: múltiples lóbulos nucleares unidos por finos puentes cromatínicos que adoptan preferentemente una disposición radial en los neutrófilos.

- **Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas**

La OMS incluye en esta categoría los síndromes en los que los pacientes presentan aspectos clínicos, biológicos y morfológicos característicos de un síndrome mielodisplásico, pero al mismo tiempo, se observan otros hallazgos compatibles con un síndrome mieloproliferativo, por lo que se denominan síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos. Así pues, pueden coexistir alteraciones morfológicas displásicas y funcionalismo anómalo en determinadas líneas hematopoyéticas, con proliferaciones efectivas de algunas de ellas o inefectivas en otras.

En los síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos, la cifra de blastos en SP o en MO es siempre inferior al 20%. En esta categoría encontramos 3 leucemias.

- Leucemia mielomonocítica crónica. Entre los criterios diagnósticos se requiere una cifra mantenida de monocitos en sangre superior a $1 \times 10^9/L$ durante un periodo superior a 3 meses, con ausencia del cromosoma Philadelphia (Ph) y del gen de fusión BCR-ABL. El diagnóstico diferencial debe realizarse con otras posibles causas de monocitosis. Los monocitos son mayoritariamente normales desde el punto de vista morfológico, si bien ocasionalmente pueden verse monocitos anormales o displásicos con una segmentación nuclear, o un patrón de la cromatina anormal, o la presencia de granulación anómala, o pliegues nucleares. En la leucemia mielomonocítica crónica la cifra de blastos es inferior al 5% en sangre e inferior al 20% en médula ósea. La displasia está presente en al menos una de las líneas. En la médula ósea, que es hiper celular, se observa la proliferación de elementos granulocíticos y monocíticos.

El inmunofenotipo revela la expresión celular de antígenos de la línea mielomonocítica (CD13, CD33) con expresión variable de CD14, CD68 y CD64.

Cabe destacar que entre un 15 y un 30% de los casos de leucemia mielomonocítica crónica progresa a una leucemia mieloide aguda.

- Leucemia mieloide crónica atípica BCR-ABL1 negativa. Consiste en la proliferación de la serie granulocítica de los elementos maduros e inmaduros y en los que se

observa una notable displasia (desgranulación, pseudo-Pelger-Huët, hipersegmentación), junto a la negatividad para el cromosoma Ph y al gen de fusión BCR-ABL. La línea más afectada en esta entidad es la de los neutrófilos. Pueden verse signos displásicos, además, en la serie eritroide y megacariocítica. En médula ósea y sangre periférica se observa un porcentaje de blastos inferior al 20%. La cifra de leucocitos es superior a $13 \times 10^9/L$.

- Leucemia mielomonocítica juvenil. Se observa en la infancia, con más frecuencia con edad inferior a 5 años. Se trata de una proliferación clonal que afecta principalmente a las líneas granulocítica y monocítica. Los pacientes presentan una monocitosis persistente superior a $1 \times 10^9/L$, junto a una cifra de blastos inferior al 20% en sangre periférica y médula ósea. El recuento de leucocitos suele situarse entre 25 y $30 \times 10^9/L$.

El cromosoma Ph o el gen de fusión BCR/ABL están ausentes. La hemoglobina fetal puede encontrarse elevada, y este hallazgo confiere un peor pronóstico a la enfermedad. Se debe realizar el diagnóstico diferencial con enfermedades infecciosas y en especial las víricas.

- **Neoplasias mieloproliferativas**

Las neoplasias mieloproliferativas suelen acompañarse de alteraciones cuantitativas y cualitativas que afectan a las tres líneas hematopoyéticas. En todas las neoplasias mieloproliferativas es característica la elevación de la celularidad en la médula ósea, con presencia de todos los estadios madurativos y con aumento de una o varias líneas hematopoyéticas en sangre periférica.

En la actual clasificación de 2016 de la OMS se incluyen las siguientes neoplasias mieloproliferativas, aunque solo comentaremos la leucemia mieloide crónica:

- Leucemia mieloide crónica BCR-ABL1 positiva. Es la neoplasia mieloproliferativa que reviste mayor importancia por su frecuencia y pronóstico. Representa el 15-20% de todas las leucemias. Aunque puede aparecer a cualquier edad, su incidencia es más elevada en las edades media y avanzada de la vida. Se trata de un trastorno clonal en la célula madre hematopoyética pluripotencial. El cuadro clínico y biológico es consecuencia de una importante proliferación de la serie granulocítica en médula ósea, sangre periférica y otros órganos hematopoyéticos, como el bazo.

El trastorno molecular tiene lugar en una célula madre muy primitiva y está asociado con una alteración citogenética adquirida. En el 90-95% de los casos existe una translocación recíproca de los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 t(9;22)(q34;q11), con la formación del cromosoma Philadelphia. El intercambio de material genético entre los cromosomas 9 y 22 da lugar a la formación del oncogén BCR-ABL1, cuya consecuencia es la producción de un ácido ribonucleico (ARN) anormal, que codifica una proteína de fusión anómala (p210) con actividad tirosinasa aumentada.

Esta oncoproteína produce disminución de la capacidad adhesiva de las células al estroma medular, aumento de la actividad proliferativa e inhibición de la apoptosis o

muerte celular programada. Esto explica el hallazgo de leucocitosis, a expensas de la serie granulocítica en todos sus estadios madurativos en la sangre periférica de los pacientes con leucemia mieloide crónica.

El diagnóstico de la leucemia mieloide crónica BCR-ABL positiva puede realizarse por los hallazgos en el frotis de sangre periférica junto con la detección del cromosoma Ph y/o positividad BCR-ABL1 por citogenética y técnicas genéticas moleculares respectivamente.

Actualmente tiene un tratamiento muy eficaz que evita la proliferación leucocitaria y la progresión de la enfermedad a la crisis blástica, y consiste en fármacos inhibidores de la tirosinasa, como el imatinib, dasatinib o nilotinib, que bloquean el centro activo de la enzima, lo que impide su activación y, por lo tanto, la proliferación mieloide.

- Leucemia neutrofílica crónica.
- Policitemia vera.
- Mielofibrosis primaria.
- Trombocitemia esencial.
- Leucemia eosinofílica crónica no especificada.

• Leucemias agudas

Las leucemias agudas son el resultado de una mutación somática en una única célula madre hematopoyética, que desencadena una proliferación clonal de células leucémicas inmaduras. En las leucemias agudas, las células blásticas proliferan en la médula ósea y reemplazan a la celularidad normal, lo que provoca una disminución de las tres series hematopoyéticas en sangre periférica, desembocando en anemia, neutropenia y trombocitopenia.

Las leucemias agudas pueden ser de dos tipos: de novo, en las que no existe un antecedente que pudiera justificar su aparición, y las secundarias, como fase evolutiva de otras enfermedades previas o por tratamientos antineoplásicos, como quimioterapia o radioterapia.

Según el tipo de precursores implicados en la expansión y proliferación de las leucemias agudas, se dividen en dos grandes grupos:

- Leucemias agudas de precursores mieloides (LMA), en las que las células proliferativas son de diferenciación mieloide, por lo que pueden implicar a la línea megacariocítica, granulomonocítica o eritroide. Los marcadores granulocíticos son: CD13, CD33, CD15, CD65, MPO.
- Leucemias de precursores linfoides o linfoblásticas agudas (LLA). Los marcadores monocíticos son: CD14, CD4, CD11b, CD64, CD36, lisozima.

• Leucemias mieloides agudas

Su incidencia es mayor en la edad adulta y es el resultado de la proliferación de un clon de blastos mieloides que son incapaces de progresar a etapas propias de su maduración.

Suelen acompañarse de dismorfias plaquetarias, a diferencia de lo que ocurre en las leucemias de precursores linfoides.

El núcleo de los mieloblastos es de perfil redondeado o angular, de cromatina laxa e inmadura y se aprecian uno o varios nucleolos visibles. El citoplasma es escaso, de coloración basófila y suele contener una escasa y fina granulación azurófila. En ocasiones, puede mostrar algún bastón de Auer, que tiene forma de aguja y su presencia parece estar relacionada con un mejor pronóstico de la LMA. Las células blásticas mieloides son positivas para la mieloperoxidasa y para el negro Sudán B.

La clasificación de la OMS, introduce algunos cambios que tienen en cuenta nuevos conceptos en la biología de las LMA, especialmente a nivel citogenético, inmunitario y molecular. A continuación, se detalla la clasificación que define las diferentes categorías de LMA según la OMS.

- LMA con anomalías genéticas recurrentes

- LMA con translocaciones/inversiones (Tabla 2):
- t(8;21): El cambio genético bloquea la diferenciación, con la consiguiente acumulación de mieloblastos. Las características morfológicas de los blastos son equivalentes a las que se observan en la LMA con maduración o M2 según la clasificación FAB.
- t(15;17): Muestra predominio de promielocitos atípicos. Morfológicamente corresponde a la variedad M3 de la clasificación FAB. La translocación del material genético entre los cromosomas 15 y 17, con la fusión de parte del gen PML del cromosoma 15 con parte del gen RARA del cromosoma 17, da lugar a la proteína PML-RAR- α , que bloquea la maduración de los promielocitos. Además, se acompaña de leucopenia, lo que dificulta el diagnóstico. Se incluyen dos variantes:
 - Variante hipergranular: Las células que proliferan en este tipo de leucemia muestran una morfología muy característica y se denominan promielocitos anormales (hipergranulares). El núcleo suele ser de aspecto monocitoide y con un perfil bilobulado o "en hachazo", con una hendidura amplia (Figura 4).

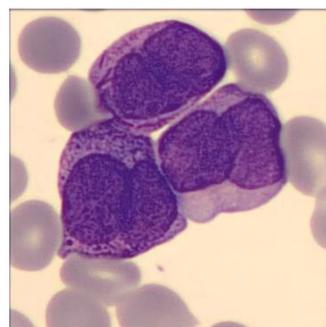


Figura 4. Promielocitos atípicos con núcleo bilobulado o "signo del hachazo". Tomado de: [Imágenes de interés de citología sanguínea. SEQC.](#)

- Variante hipogranular: Tiene peor pronóstico que la hipergranular y suele cursar con leucocitosis. Constituye el 15-20% de las LMA

- con t(15;17). Se caracteriza por la escasez o ausencia de granulación en las células leucémicas. Los promielocitos son grandes y conservan el "signo del hachazo" pero el citoplasma es más basófilo.
- inv(16): Presencia de blastos de aspecto morfológico mieloide y monocítico. Equivale a la variante M4 con eosinofilia según la clasificación FAB. Puede verse en las células blásticas granulación primaria visible y algún bastón de Auer ocasional. Este tipo de LMA se asocia con la presencia de eosinófilos anómalos en médula ósea.
 - t(9;11): Se asocia a la presencia de blastos monocíticos y corresponde a las leucemias M4 y M5 de la clasificación FAB.
 - t(6;9): Es poco frecuente. Suele presentar las características morfológicas y citoquímicas de las variedades M2 o M4 de la clasificación FAB.
 - inv(3): Es poco frecuente. Puede derivar de un síndrome mielodisplásico previo. Los blastos muestran una morfología característica de cualquiera de los subtipos FAB, excepto la M3.
 - t(1;22): Es poco frecuente. Los pacientes presentan anemia, trombocitopenia y moderada leucocitosis en sangre periférica.
- **LMA con mutaciones genéticas:**
- LMA con mutación del gen de la nucleofosmina (NPM1). Esta mutación se detecta en una tercera parte de las LMA. El gen NPM1 codifica la proteína nucleofosmina, que se encuentra en el nucleolo y desempeña un papel muy importante en numerosas funciones celulares, como la formación de algunas

Translocación/inversión	Incidencia	Morfología	Antígenos
t(8;21)	8%	Basofilia Bastones de Auer	Antígenos mieloides CD19 CD34
t(15;17) hipergranular	5-8% 80% de t(15;17)	Promielocitos grandes Astillas	CD13 CD33
t(15;17) hipogranular	5-8% 20% de t(15;17)	Promielocitos grandes Núcleo irregular	CD13 CD33
Inv(16)	10%	Eosinófilos anómalos	CD34 CD117
t(9;11)	9-12%	Blastos monocíticos Nucleolos Mamelones	CD14 CD4 CD11b CD11c CD64 CD36
Inv(3)	1-2%	Neutrófilos desgranulados y pseudo-Pelger	CD34 CD13 CD33 HLA-DR
t(6;9)	<1%	M2 o M4	CD13 CD33 HLA-DR
t(1;22)	<1%	Blastos medianos 1-3 nucleolos Mamelones	CD41 CD61

Tabla 2. Principales características de las leucemias mieloides agudas con translocaciones/inversiones. Elaboración propia.

proteínas, replicación del ADN o progresión del ciclo celular. La mutación NPM causa cambios críticos en la estructura de la proteína, y por ello esta abandona el núcleo y se acumula de forma aberrante en el citoplasma. En la analítica de los pacientes se observa con frecuencia anemia y plaquetopenia. Existe una intensa asociación entre la mutación NPM1 y los subtipos morfológicos mielomonocíticos o monocíticos (M4, M5). La morfología de los blastos es característica: aspecto mielode, cromatina con depresión en forma de "huella digital" (Figura 5). Expresan los antígenos mieloides CD33, CD13, MPO.

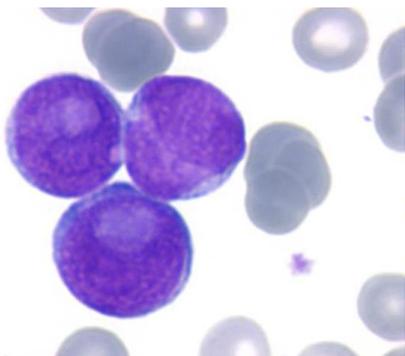


Figura 5. Depresión en la cromatina de las células blásticas en forma de "huella digital". Tomado de: Imágenes de interés de citología sanguínea. SEQC.

- LMA con mutación del gen CEBPA. Los blastos son morfológicamente mieloides.
- LMA con BCR-ABL1. Esta nueva categoría se ha incluido en la clasificación de la OMS de 2016 para distinguir los casos de LMA de novo que pueden beneficiarse del tratamiento con inhibidores de la tirosinasa. En todos los casos se demuestra t(9;22) o evidencia molecular de fusión BCR-ABL1.
- LMA con mutación en RUNX1. Incluye las LMA de novo que presentan la mutación en RUNX1 que no se asocian a anomalías citogenéticas relacionadas con mielodisplasia. Esta entidad tiene peor pronóstico que el resto de LMA.
- **LMA con cambios relacionados con displasia.** Es una LMA con hallazgos morfológicos displásicos, o bien que se desarrolla en pacientes con un síndrome mielodisplásico o mielodisplásico/mieloproliferativo con anomalías citogenéticas relacionadas con mielodisplasia.
- **Neoplasias mieloides relacionadas con tratamientos previos.** Engloba a todos los pacientes que han desarrollado una neoplasia mielode después de haber recibido terapia citotóxica (agentes alquilantes o inhibidores de la topoisomerasa II). Esta categoría incluye tanto las LMA como los síndromes mielodisplásicos relacionados con tratamientos previos. Las anomalías citogenéticas asociadas son importantes para definir el tratamiento más adecuado y establecer el pronóstico.
- **LMA no categorizadas previamente, que incluyen:**
 - Subtipos de la clasificación FAB no incluidos en el apartado de anomalías genéticas recurrentes. En este grupo se incluyen subtipos de LMA basados en las características morfológicas de los elementos blásticos:
 - LMA mínimamente diferenciada (M0). Blastos con rasgos morfológicos linfoides y mieloides. Los blastos son medianos, citoplasma moderadamente basófilo y ausencia de bastones de Auer. En el estudio inmunofenotípico al menos un marcador mielode es positivo (MPO, CD13 o CD33) mientras que los linfoides son negativos.
 - LMA sin maduración (M1). Los blastos son de tamaño mediano, núcleo con uno o varios nucleolos prominentes. Se puede observar una fina granulación azurófila o algún bastón de Auer. La presencia de estos bastones en una LMA se relaciona con un mejor pronóstico. Estas células blásticas son mieloperoxidasa positivas. En el estudio inmunofenotípico se demuestra que los blastos expresan antígenos mieloides (CD33, CD13, CD117).
 - LMA con maduración (M2). A diferencia de la M1 muestra un número mayor de células en estadios madurativos posteriores al mieloblasto (promielocitos, mielocitos y neutrófilos) en un porcentaje superior al 10%. Constituye el 30% de todos los casos de LMA. El tamaño de los blastos es pequeño o mediano, con perfil nuclear en ocasiones rectangular. Pueden contener algún bastón de Auer.
 - LMA promielocítica (M3). Los blastos presentan gran cantidad de gránulos, por lo que son MPO+. Al liberarse el contenido lisosómico de los gránulos, activa la coagulación, por lo que un 75-90% de los casos cursa con coagulación intravascular diseminada. Es típica la translocación t(15;17) que implica a los genes MPL y RAR- α .
 - LMA mielomonocítica (M4). Se observan mieloblastos y monoblastos. Los blastos monocíticos son de gran tamaño con citoplasma con basofilia variable que en ocasiones presenta mamelones. Los nucleolos acostumbran a ser prominentes.
 - LMA monoblástica (M5a) o monocítica (M5b). Las células leucémicas son de estirpe monocítica (monoblastos y promonocitos). Los elementos blásticos son de gran tamaño, con un citoplasma intensamente basófilo. Es posible la observación ocasional de una fina granulación azurófila o de algún bastón de Auer.
 - Leucemia aguda eritroide (M6). Proliferación neoplásica de proeritroblastos indiferenciados

que pertenecen a la serie eritroide, siendo el 80% de las células de la médula ósea de estirpe eritroide.

- Leucemia aguda megacarioblástica (M7). Los blastos muestran un aspecto morfológico muy indiferenciado o inmaduro y son muy polimórficos. También pueden presentar mamelones o pseudópodos.
- Leucemia aguda basofílica. Muestra una incidencia inferior al 1% y en ella las células blásticas han iniciado su diferenciación basófila. Está asociada con el aumento de las cifras sanguíneas de histamina.
- Panmielosis aguda con mielofibrosis. Es una proliferación mieloide que se acompaña de una intensa fibrosis de la médula ósea, con marcada pancitopenia y evolución rápidamente progresiva. Es una forma poco frecuente de LMA.
- **Sarcoma mieloide.**
- **Proliferaciones mieloides en relación con el Síndrome de Down.**
- **Neoplasias de células blásticas dendríticas plasmocitoides.**

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Merino A. Manual de Citología de Sangre Periférica y Líquidos Biológicos. 2ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2020.
- Michniacki TF. Leucopenia. En: Kliegman RM, ed. Nelson. Tratado de pediatría. 21ª ed. Barcelona: Elsevier España; 2020. p. 1141–1147 p.
- Berliner N. Leucocitosis y leucopenia. En: Goldman L, ed. Goldman-Cecil. Tratado de medicina interna. 25ª ed. Barcelona: Elsevier España; 2019. p. 1129–1138.
- Merino A. Valores normales del hemograma: ¿Cuándo hay que alarmarse? Jano. 2008;(1709):42-6.
- Grant MA, Karsan A. The Blood Vessel Wall [Internet]. En: Silberstein LE, Anastasi J, Hoffman R, Benz Jr. EJ, eds. Hematology: Basic Principles and Practice. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018. p. 1843-1856.e6 p.
- Ritchey AK, O'Brien SH, Keller FG. Hematologic Manifestations of Childhood Illness [Internet]. En: Silberstein LE, Anastasi J, Hoffman R, Benz Jr. EJ, eds. Hematology: Basic Principles and Practice. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018. p. 2215-2237.e9

HEMOSTASIA Y COAGULACIÓN

Autores: David Cuevas Gómez¹; Sandra Gómez Rojas²

¹ Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

² Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Hemostasia, Coagulación, Diagnóstico

INTRODUCCIÓN

La hemostasia es el conjunto de fenómenos fisiológicos que ocurren en el organismo como consecuencia de un daño vascular con el fin de detener la pérdida de sangre.

El sistema hemostático presenta tres funciones principales:

- Mantener permeable la luz vascular.
- Establecer el tapón hemostático ante una lesión vascular.
- Generar la lisis del coágulo de fibrina una vez reparada la lesión.

Para cumplir con estas funciones, el sistema hemostático presenta dos tipos de componentes:

- Componente celular: Constituido por las plaquetas y el endotelio vascular.
- Componente plasmático: Formado por proteínas procoagulantes o generadoras de fibrina, anticoagulantes y fibrinolíticas.

La alteración de cualquiera de estos componentes puede originar la aparición de un síndrome hemorrágico o una situación de hipercoagulabilidad.

La hemostasia se desarrolla en tres etapas:

- Hemostasia primaria: En esta primera etapa tiene lugar la formación del tapón plaquetario.
- Hemostasia secundaria: Se produce la generación del coágulo de fibrina.
- Fibrinólisis: Tiene lugar la degradación de las redes de fibrina formadas en la etapa anterior.

HEMOSTASIA PRIMARIA

- **Fisiología de la hemostasia primaria**

La hemostasia primaria tiene por finalidad la formación del tapón hemostático plaquetario.

Durante esta etapa ocurren cuatro acontecimientos claves: en primer lugar una **vasoconstricción** local que minimiza las pérdidas de sangre. A continuación, se produce la **agregación** de las plaquetas al subendotelio seguido de la **activación** de las mismas. Finalmente se forma el **trombo plaquetario**. En estos procesos van a intervenir tanto las plaquetas como el endotelio (monocapa de células que tapiza la luz de todos los vasos).

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos que se forman en la médula ósea a partir de unas células precursoras llamadas megacariocitos.

La vida media de las plaquetas en sangre es de unos 10 días, aproximadamente. En su interior contienen dos tipos de gránulos: los gránulos densos (ricos en calcio, ATP, ADP, epinefrina y serotonina) y los gránulos α (ricos en proteínas). En su superficie presentan diferentes glicoproteínas de membrana como GPIb-V-IX, GPIIb-IIIa o la GPVI.

Cuando se daña el endotelio se quedan expuestos hacia el torrente sanguíneo el colágeno y el factor de von Willebrand de las células subendoteliales. Las plaquetas se unen al colágeno indirectamente gracias al complejo GPIb-V-IX, que interacciona con el factor de von Willebrand el cual actúa de puente y se une al colágeno. Las plaquetas también se unen directamente al colágeno a través de la GPVI. De esta manera se establecen enlaces firmes entre las plaquetas y el subendotelio.

Esta adhesión inicial favorece la activación plaquetaria. Las plaquetas activadas cambian su forma, aumentan su superficie celular y secretan el contenido de los gránulos al medio. De los gránulos densos se libera por un lado, calcio que favorece la agregación plaquetaria y la coagulación y, por otro lado, serotonina y noradrenalina que actúan produciendo un efecto vasoconstrictor local. De los gránulos alfa se liberan distintos factores de crecimiento para reparar la lesión vascular y también otras proteínas (como la fibronectina o el fibrinógeno) que favorecen la adhesión de más plaquetas al endotelio lo que finalmente lleva a la formación del tapón plaquetario.

- **El trombograma**

El trombograma es el análisis cuantitativo y cualitativo de todas las magnitudes relacionadas con las plaquetas. El trombograma convencional incluye el recuento plaquetas presentes en sangre periférica, el volumen medio plaquetario y el ancho de distribución de las plaquetas.

El recuento de plaquetas puede hacerse de forma manual en cámara de Neubauer o automatizada. Actualmente los métodos manuales se han sustituido por métodos automatizados que utilizan técnicas basadas en la impedancia, la dispersión óptica, la fluorescencia o técnicas inmunométricas. La impedancia es el método más extendido para la realización del trombograma y se basa en la resistencia electrónica que muestran las células suspendidas en un líquido conductor (como es la sangre). El número de señales eléctricas registradas indica el número de células presentes en la sangre y la amplitud de estas señales es directamente proporcional al volumen celular. Los resultados se representan gráficamente mediante un histograma y en base al volumen celular se pueden clasificar las tres poblaciones de células presentes en la sangre.

La cifra normal de plaquetas en sangre periférica se encuentra entre 140.000 y 450.000 unidades por microlitro. Sin embargo, hay que tener presente que se pueden obtener recuentos de plaquetas falsamente reducidos ante la presencia de plaquetas aglutinadas. Por otro lado, también pueden aparecer resultados falsamente elevados si existen fragmentos eritrocitarios en la muestra.

El volumen plaquetario medio es una magnitud que indica el tamaño o medio de la población de plaquetas de un individuo. Este parámetro correlaciona con la regeneración plaquetaria y generalmente, un valor elevado indica una alta tasa de recambio plaquetaria mientras que un valor por debajo del intervalo de referencia generalmente indica un defecto en la producción de plaquetas.

Por último, el ancho de distribución de las plaquetas determina el grado de anisocitosis (diferencias en el tamaño) de las plaquetas. Un valor elevado de este parámetro puede encontrarse en ciertas neoplasias mieloproliferativas.

- **Alteraciones plaquetarias**

- **Trombocitopenia**

La alteración más frecuente de las plaquetas es la disminución de su recuento que se define como trombocitopenia. La trombocitopenia representa la causa más frecuente de hemorragias por alteraciones en la hemostasia y en la mayoría de los casos se debe a causas adquiridas (Figura 1).

Las trombocitopenias adquiridas pueden deberse a un descenso en la producción de las plaquetas (lo que implica una afectación medular), a un incremento de su secuestro por parte del bazo (como ocurre en el hiperesplenismo asociado a las cirrosis), a un consumo elevado de las mismas a nivel vascular (como se da en la coagulación intravascular diseminada o ante lesiones vasculares extensas) o a un incremento de su destrucción a nivel periférico (púrpura trombocitopénica idiopática y púrpura trombótica trombocitopénica).

La púrpura trombocitopénica idiopática es un trastorno autoinmune debido a la presencia de anticuerpos antiplaquetarios (IgG o IgM) que cursa con una destrucción masiva de plaquetas a nivel periférico.

Por otro lado, la púrpura trombótica trombocitopénica cursa con trombocitopenia intensa por consumo intravascular junto con anemia hemolítica microangiopática. Además de la anemia y la trombocitopenia en el frotis de sangre periférica se suele observar presencia de esquistocitos.

Dentro de las trombopenias congénitas se distinguen fundamentalmente tres patologías: en primer lugar, la macrotrombocitopenia mediterránea familiar es un trastorno autosómico dominante, común en los países mediterráneos, y no suele cursar con hemorragias graves, salvo ante ciertas cirugías o traumatismos.

Por otro lado, el síndrome de Bernard-Soulier es una enfermedad autosómica recesiva que afecta a los genes que codifican el complejo de glucoproteínas Ib-V-IX presente en la membrana de las plaquetas.

Por último, las macrotrombocitopenias relacionadas con el gen MYH9 son un grupo de enfermedades con una herencia

autosómica dominante originadas por la alteración del gen que codifica la cadena pesada de la miosina no muscular IIA. La mayoría de estos pacientes presentan desde el nacimiento macrotrombocitopenia junto con inclusiones leucocitarias (cuerpos de Dohle). Algunos además presentan hipoacusia, cataratas y glomerulopatía.

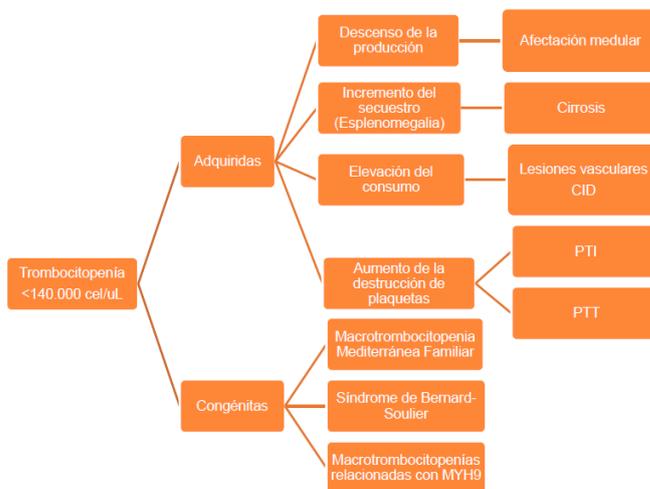


Figura 1. Esquema de las causas de trombocitopenia. Elaboración propia.

- **Trombocitosis**

La trombocitosis o aumento de la cifra de plaquetas en sangre periférica puede ser debido a dos razones fundamentalmente.

En primer lugar, a un fenómeno reactivo a distintas patologías como cáncer, infecciones, ferropenia o después de una hemorragia. Se considera un proceso fisiológico que desaparece tras eliminar la causa que lo produjo y no suele estar relacionado con alteraciones en la hemostasia. No aumenta el riesgo trombótico.

Por otro lado, también puede deberse a una neoplasia mieloproliferativa como la leucemia mieloide crónica o la trombocitemia esencial.

- **Evaluación de la hemostasia primaria**

El diagnóstico correcto de los trastornos de la hemostasia primaria debe partir de una historia clínica detallada. La manifestación clínica característica es la presencia de diátesis hemorrágica: una erupción plana o papular de la piel y las mucosas como consecuencia de la rotura de pequeños vasos sanguíneos. Otros síntomas que orientan hacia el trastorno de la hemostasia primaria son la epistaxis o la aparición de hemorragias desproporcionadas ante traumatismos o intervenciones quirúrgicas. Es importante también tener en cuenta la edad de presentación de los síntomas y los antecedentes familiares ya que una aparición temprana junto con otros miembros de la familia afectados orientan hacia un trastorno hereditario.

Una vez establecida una sospecha diagnóstica se debe realizar un hemograma para valorar el recuento de plaquetas. Una cifra por debajo del intervalo de referencia puede explicar los síntomas, aunque no suelen aparecer hemorragias significativas hasta que no se alcanzan cifras inferiores a

50.000 células/ μL . Una cifra elevada debe valorarse en el contexto clínico del paciente ya que las trombocitosis pueden ser reactivas a muchas causas.

Una alteración en la cifra de plaquetas debe confirmarse con la realización de un frotis de sangre periférica para descartar las pseudotrombocitopenias. Sobre todo, en el caso de las trombocitopenias debe confirmarse que la muestra no presenta agregados. Además, las alteraciones morfológicas observadas en las plaquetas pueden guiar el diagnóstico.

Si todos los resultados hasta el momento son normales, la clínica del paciente puede deberse a una alteración cualitativa de las plaquetas y para evaluar estos casos se realiza la determinación del tiempo de obturación que aporta una información similar al tiempo de hemorragia *in vitro*, valorando así la funcionalidad plaquetaria. Este sistema utiliza la sangre total anticoagulada con citrato, que se hace pasar a través de un orificio micrométrico en una membrana recubierta con colágeno/epinefrina (Col-EPI) y en otra membrana con colágeno/ADP (Col-ADP). El contacto con los agonistas inicia la agregación plaquetaria que termina por ocluir el orificio de la membrana causando un cambio en la transmisión de la luz que detecta un microprocesador. Esta técnica se basa en medir el tiempo que tarda en producirse la oclusión de esta membrana. Se pueden encontrar elevaciones de este tiempo en patologías de la función plaquetaria como el síndrome de Bernard-Soulier, la trombocitopenia de Glanzmann o la Enfermedad de von Willebrand. Además, esta prueba también puede detectar la presencia de ciertos fármacos que alteren la hemostasia primaria como el ácido acetilsalicílico que origina elevación del tiempo de oclusión para el colágeno-epinefrina pero mantiene dentro de los rangos el tiempo de obturación de colágeno-ADP. Por otro lado, el clopidogrel origina el patrón inverso.

Ante un resultado alterado en el tiempo de obturación o una alta sospecha clínica se debe recurrir a técnicas de agregometría. La agregometría por impedancia eléctrica se basa en la monitorización del cambio de impedancia producido por la agregación de las plaquetas a un electrodo en respuesta a varios agonistas: ADP, ácido araquidónico, ristocetina y trombina. Los resultados se representan gráficamente y el patrón de curvas alteradas orienta hacia el diagnóstico de las distintas patologías. Para estos estudios se precisa de sangre recogida en tubos con hirudina.

HEMOSTASIA SECUNDARIA:

• Fisiología de la hemostasia secundaria

Durante la hemostasia secundaria se produce la activación de los diferentes factores de coagulación para generar fibrina. Esta fibrina formará una malla que reforzará el tapón plaquetario dando lugar al coágulo.

La mayoría de los factores de coagulación son proteínas sintetizadas en el hígado que se encuentran en sangre como zimógenos inactivos que pueden ser activados y transformados en enzimas con actividad proteasa limitada.

Los factores II, VII, IX y X necesitan vitamina K para su síntesis debido a que para ser funcionales van a sufrir la carboxilación de un residuo de glutámico tras su traducción y en este proceso interviene la vitamina K como cofactor.

Según el modelo clásico, existen dos vías de activación de la coagulación: la vía extrínseca y la vía intrínseca. La vía extrínseca se inicia cuando el factor tisular del subendotelio o del endotelio activado entra en contacto con la sangre. Entonces, esta proteína interacciona con el factor VII. Este complejo FT-VII es capaz de activar al factor X lo que origina la activación de la vía final común de la coagulación.

La vía intrínseca se activa cuando la sangre entra en contacto con superficies cargadas negativamente como el colágeno, el cristal o el caolín, entonces, el factor XII, la precalicreína y el cininógeno se van a activar y van a originar a su vez la activación del factor XI el cual activará al factor IX. El factor IXa se unirá con el VIII y con el X para formar el complejo tenasa que producirá la activación del factor X.

En la vía final, el factor X activado se une al factor V y en presencia de calcio y fosfolípidos forman el complejo protrombinasa capaz de convertir la protrombina en trombina. La principal función de la trombina consiste en convertir el fibrinógeno en fibrina formando así el coágulo. Por otro lado, la trombina también puede originar la activación de la proteína C que tiene funciones anticoagulantes y por tanto limita la sobreactivación de la cascada de coagulación.

Finalmente, el factor XIII se unirá a la fibrina incrementando la estabilidad de ésta mediante la formación de enlaces intermoleculares covalentes.

Todo este proceso está sometido a mecanismos de regulación para garantizar un correcto equilibrio entre la formación y la degradación del coágulo. Los mecanismos de regulación de la hemostasia secundaria actúan de dos maneras diferentes. Por un lado, inhibiendo la función de los factores activados. Así actúa, por ejemplo, la antitrombina. La función inhibitoria de la antitrombina se incrementa enormemente en presencia de heparina o de su equivalente fisiológico: el heparán sulfato.

El otro sistema de regulación de la hemostasia secundaria se realiza a través de la proteína C que una vez activada, actúa como un potente anticoagulante degradando los factores V y VIII. En esta actividad proteolítica actúa como cofactor la proteína S.

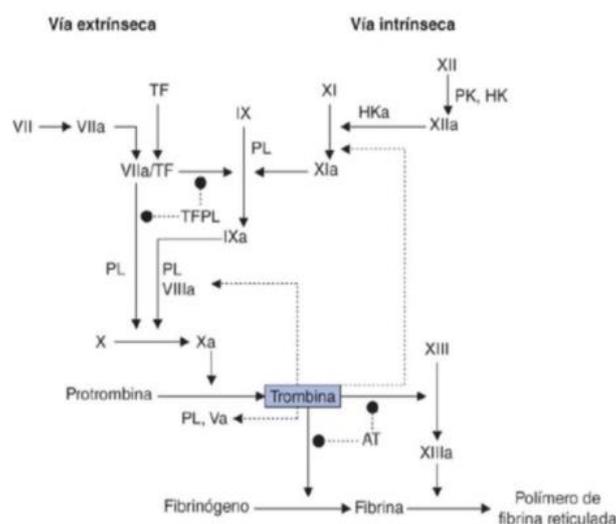


Figura 2. Esquema de las vías de coagulación según el modelo clásico. Tomado de: Nicoll *et al.*, 2014.

- **Técnicas empleadas para la evaluación de la hemostasia secundaria**

El estudio clásico de los distintos tiempos de coagulación se realiza mediante técnicas coagulométricas. Estas técnicas 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.

En los últimos años se han desarrollado nuevos equipos a cabecera de paciente capaces de evaluar la hemostasia global basados en tromboelastografía. La tromboelastografía permite estudiar las propiedades viscoelásticas del coágulo de una manera global y dinámica. Esta técnica se basa en la incubación de una muestra de sangre total en una cubeta inclinada en la cual se inserta un eje que al girar detecta la rigidez del coágulo. El resultado del análisis de coagulación se obtiene de forma gráfica y de manera simultánea a la formación del coágulo. Sobre esta gráfica se calculan distintos parámetros que aportan información sobre las diferentes fases de la hemostasia.

Las pruebas convencionales que evalúan la hemostasia básica no tiene en cuenta los componentes celulares y únicamente proporcionan información sobre el tiempo de iniciación de la formación de fibrina, por ello, presentan un valor limitado para el manejo del paciente con hemorragia intensa. En cambio, la tromboelastografía se realiza sobre una muestra de sangre total y en un corto periodo de tiempo lo que permite obtener de manera rápida una valoración global de la hemostasia teniendo en cuenta la interacción entre los factores de coagulación y los componentes celulares.

- **Evaluación de la hemostasia secundaria**

- **Tiempo de protrombina (TP)**

Uno de los parámetros básicos en el estudio de la hemostasia secundaria es el tiempo de protrombina que es el tiempo que tarda el plasma en coagular tras la adición del factor tisular recombinante, fosfolípidos y calcio. El resultado se puede expresar en segundos, en porcentaje con respecto al TP control o como INR que es el cociente entre el TP del paciente y el del control elevado al índice de sensibilidad internacional de la tromboelastina utilizada en la determinación.

El TP se utiliza para evaluar la vía extrínseca y la vía final de la coagulación y también para monitorizar el tratamiento con anticoagulantes orales antagonistas de la vitamina K como el sintrom o la warfarina. Estos fármacos inhiben las modificaciones postraduccionales dependientes de vitamina K que sufren los factores II, VII, IX y X para ser funcionales. Dado que tres de estos cuatro factores forman parte de la vía extrínseca o de la vía final de la coagulación, se va a modificar sobre todo el TP.

Un resultado normal en el TP descarta la alteración de los factores de la vía extrínseca y de la vía final común

Ante un resultado alterado del TP se debe comprobar en primer lugar, que la cantidad de sangre de la muestra esté bien enrasada con respecto a la marca del tubo. En segundo lugar, se debe descartar la existencia de poliglobulia y la toma de

fármacos antagonistas de la vitamina K o anti factor Xa en base a la historia del paciente. Una vez descartadas estas situaciones, un TP elevado puede indicar la presencia de hepatopatía por lo que se debe evaluar el perfil hepático del paciente.

Si ninguna de estas situaciones explica la clínica del paciente entonces se debe realizar un test de mezclas: añadiendo al plasma del paciente la misma cantidad de plasma control y volviendo a determinar el TP. Si el TP corrige y pasa a ser normal indica un déficit de los factores de la vía extrínseca o de la vía común. La desnutrición o el síndrome de malabsorción pueden reducir los niveles de vitamina K y explicar así la elevación del TP. Si estas dos entidades no explican el cuadro del paciente se procederá a la dosificación de los factores de la vía extrínseca y común (X, V y II) ya que se han descrito deficiencias congénitas de todos estos factores. La confirmación de esta patología se realizará con pruebas genéticas.

Si por el contrario el TP no corrige tras la prueba de mezclas habrá que sospechar la presencia de un inhibidor como anticuerpos frente al factor X o el factor V o bien el consumo no documentado de fármacos con actividad anti-Xa.

- **Tiempo de tromboelastina parcial activada (TTPa)**

El TTPa es el tiempo que tarda el plasma en coagular tras añadir un compuesto que aporta una superficie cargada negativamente (como la sílica o el caolín), fosfolípidos y calcio a una muestra de plasma anticoagulada con citrato. El resultado se expresa en segundos y se utiliza para evaluar fundamentalmente la vía intrínseca de la coagulación.

Esta prueba se utiliza para monitorizar el tratamiento con heparina no fraccionada. La heparina es una glucosaminoglucano muy sulfatado ampliamente utilizado como fármaco anticoagulante. Se puede encontrar en dos presentaciones farmacológicas: la heparina no fraccionada y la heparina de bajo peso molecular. Ambos fármacos van a producir la activación de la antitrombina III, la cual va a bloquear la activación de factor X y, además, la heparina no fraccionada va a promover la interacción entre la antitrombina III y la trombina bloqueando la acción de esta última en el proceso de coagulación. Sin embargo, la heparina de bajo peso molecular apenas tiene efecto sobre la trombina.

El tratamiento con heparina no fraccionada se monitoriza utilizando el TTPa mientras que la administración de heparina de bajo peso molecular no suele requerir monitorización debido a que no afecta el resultado del TTPa hasta dosis verdaderamente elevadas.

Un resultado normal del TTPa no descarta una alteración del factor VII o del factor XIII mientras que un resultado elevado debe ser estudiado.

En primer lugar, se debe comprobar que el tubo de citrato esté bien enrasado. También se debe descartar la presencia de poliglobulia

Otras causas a valorar consultado la historia del paciente son el tratamiento con heparina o fármacos anti factor X activado o inhibidores de la trombina.

Una vez descartadas estas situaciones, se debe ampliar el tiempo de trombina. El tiempo de trombina mide el tiempo que tarda en aparecer el coágulo tras la adición de trombina al plasma citratado y sirve para evaluar la etapa final de la coagulación: la formación de fibrina a partir del fibrinógeno. Un tiempo de trombina alargado puede indicar hipofibrinogenemia, disfibrinogenemia, hiperfibrinólisis o la presencia de fármacos como la heparina no fraccionada o los inhibidores de la trombina.

Un TT normal junto con un TTPa alargado indica un déficit de alguno de los factores de coagulación de la vía intrínseca o bien la presencia en el plasma de algún elemento que bloquee la acción de estos factores (Figura 3).

Para diferenciar entre estas dos situaciones se suele realizar un test de mezclas. Si el TTPa corrige, es decir se encuentra dentro de los valores de normalidad esto sugiere el déficit de alguno de los factores de la vía intrínseca mientras que si se mantiene elevado indica la presencia de algún inhibidor como los anticuerpos anti-factor VIII (detectados mediante la técnica de Bethesda) o el anticoagulante lúpico.

Si el TTPa corrige tras la prueba de mezclas esto indica un déficit de los factores de la vía intrínseca que puede deberse al consumo de fármacos anti-vitamina K (ya que el factor IX es dependiente de vitamina K) o a una hepatopatía crónica. Otras causas menos comunes son la hemofilia A (déficit genético del factor VIII), la hemofilia B (déficit genético del factor IX) o a la enfermedad de von Willebrand.

El diagnóstico de hemofilias se realiza mediante la dosificación de los factores de la vía intrínseca que consiste en preparar distintas alícuotas del plasma del paciente y añadir a cada una de ellas uno de los factores de la vía intrínseca y medir el TTPa en todas ellas. La alícuota en la que el TTPa corrija y presente valores normales pondrá de manifiesto que el paciente presenta un déficit del factor que se haya añadido a dicha alícuota. Finalmente, se realizarán pruebas genéticas para detectar la variante causante de la patología.

La enfermedad de von Willebrand es un trastorno genético que conduce al déficit cuantitativo o cualitativo del factor de von Willebrand que interviene en la adhesión de las plaquetas al colágeno y además transporta el factor VIII en sangre. Se

diagnostica con pruebas de agregometría que mostrarán resultados alterados a la ristocetina. También se puede medir la cantidad circulante del factor de von Willebrand.

Por otro lado, si se detecta una elevación del TTPa junto con elevación del TT se debe realizar la determinación del tiempo de reptilasa. En esta prueba se utiliza la batroxobina procedente del veneno de la víbora de barba amarilla que es capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina y que, por tanto, no se va a ver afectado por la presencia de compuestos con actividad anti-trombina. En el caso de que el tiempo de reptilasa sea normal se confirma la presencia de heparina o inhibidores de la trombina en la muestra mientras que si es elevado se debe sospechar de alteraciones en el fibrinógeno por lo que en primer lugar se evaluará su concentración.

- Fibrinógeno

El último parámetro que forma parte del estudio básico de la coagulación es el fibrinógeno. El fibrinógeno es una proteína plasmática sintetizada en el hígado y precursora de la fibrina.

Los niveles de fibrinógeno se pueden calcular mediante métodos inmunológicos o coagulométricos.

El método coagulométrico o de Clauss estima la concentración de fibrinógeno en presencia de altas cantidades de trombina, de modo que el tiempo que transcurre hasta la formación del coágulo será inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno de la muestra.

El aumento de los niveles de fibrinógeno tiene poca repercusión clínica ya que el fibrinógeno es un reactante de fase aguda positiva y se eleva ante cualquier proceso inflamatorio.

La disminución de los valores de fibrinógeno estimados mediante un método coagulométrico indica la existencia de hipofibrinogenemia o disfibrinogenemia. Para distinguir estas dos entidades habría que realizar la determinación antigénica del fibrinógeno mediante métodos inmunológicos. En las hipofibrinogenemias, los niveles de fibrinógeno antigénico se encuentran disminuidos, mientras que en las disfibrinogenemias los niveles antigénicos son normales.

FIBRINOLISIS

La fibrinólisis consiste en la eliminación del coágulo de fibrina durante la cicatrización de la herida y también se encarga de eliminar los coágulos intravasculares para impedir la trombosis.

El proceso comienza con la activación del plasminógeno, una proteína sintetizada en forma de zimógeno por el hígado y liberada a la circulación sanguínea.

El plasminógeno se convierte en su forma activa denominada plasmina por acción de distintas proteínas conocidas como activadores del plasminógeno. Algunas de estas proteínas son: el factor XII activado, la trombina, el activador tisular del plasminógeno y también ciertas proteínas bacterianas.

La plasmina degrada la fibrina y los factores V y VIII. El proceso de degradación de la fibrina va a originar un conjunto de péptidos conocidos globalmente como productos de

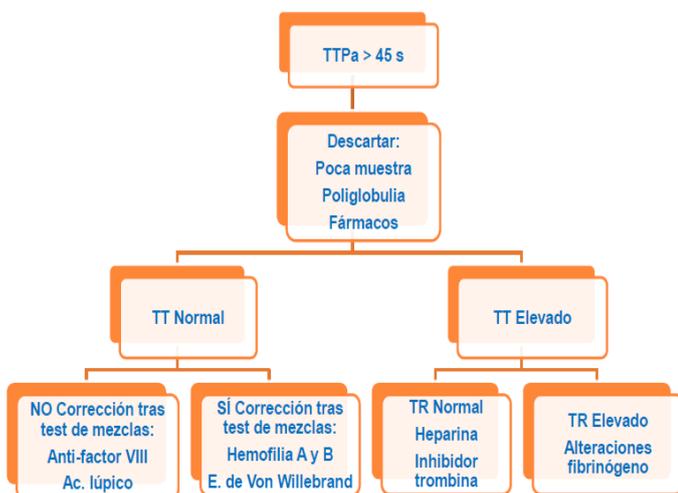


Figura 3. Protocolo de actuación ante un TTPa elevado.
Elaboración propia.

degradación de la fibrina entre los que se encuentran los dímeros D.

La vida media del dímero D es de unas ocho horas y se elimina principalmente por vía renal. Se encuentran valores elevados del dímero D en situaciones que se acompañan de un aumento de la actividad fibrinolítica como en la enfermedad tromboembólica venosa y, por el contrario, la ausencia de dímero D en plasma puede sugerir que la formación del trombo no ha tenido lugar.

El dímero D presenta un elevado valor predictivo negativo para el diagnóstico de la enfermedad tromboembólica venosa de modo que valores inferiores a 500 ng/mL prácticamente descartan esta patología.

La enfermedad tromboembólica venosa comprende dos entidades clínicas que comparten tratamiento: la trombosis venosa profunda y el tromboembolismo pulmonar. Ambas entidades poseen una mortalidad entre 10-17% y pueden cursar de forma silente, con síntomas inespecíficos o incluso provocar una muerte súbita.

Las guías actuales recomiendan aplicar escalas clínicas como la escala de Wells simplificada para evaluar el riesgo que tiene el paciente de presentar una enfermedad tromboembólica venosa. Ante un elevado riesgo se realizará directamente una ecografía venosa para confirmar o descartar totalmente la patología. En aquellos pacientes con un riesgo bajo o moderado se evaluarán los niveles plasmáticos de dímero D: si son inferiores a 500 ng/mL, se descarta el diagnóstico de la patología mientras que un resultado por encima de este valor implica la realización de una ecografía venosa para confirmar el diagnóstico.

TROMBOFILIA

El término trombofilia se define como la tendencia a desarrollar episodios trombóticos debido a factores genéticos o adquiridos, o más frecuentemente a la combinación de ambos. La trombofilia se traduce en un aumento de la generación de trombina originada por un desequilibrio en el sistema hemostático dando lugar a un estado de hipercoagulabilidad sanguínea. Clínicamente la trombofilia se manifiesta mediante la aparición de la enfermedad tromboembólica venosa.

La aparición de la enfermedad tromboembólica venosa suele deberse a una combinación de factores genéticos y adquiridos.

Las pruebas utilizadas para el estudio de trombofilias se clasifican en dos grupos: aquellas encaminadas a la detección de una alteración de la función inhibitoria de la coagulación como los déficits de antitrombina, proteína C y la proteína S o aquellas destinadas a identificar incrementos de la actividad procoagulante como las mutaciones del factor V, de la trombina o el síndrome antifosfolípido.

El déficit de antitrombina es el déficit de los anticoagulantes naturales más severos clínicamente. Para la determinación de los niveles de antitrombina se emplea un método cromogénico que utiliza trombina recombinante. Esta enzima va a degradar un sustrato cromogénico para producir un compuesto coloreado. Para medir la actividad de la antitrombina se añade a la muestra heparina que incrementará la actividad de la antitrombina la cual bloqueará a su vez la reacción catalizada

por la trombina de tal manera que la intensidad de color registrada será inversamente proporcional a la actividad de la antitrombina.

El déficit de la proteína C conduce a una sobreactivación de los factores V y VIII de la coagulación lo que aumenta el riesgo de ETV. Para el estudio inicial del déficit de la proteína C se suelen utilizar métodos cromogénicos similares a los de la antitrombina en los que se emplea un sustrato cromogénico específico para la proteína C y el veneno de una serpiente del género *Agkistrodon* capaz de originar la activación de la proteína C.

Para la determinación de los niveles de la proteína S (cofactor de la proteína C) se recomienda iniciar el estudio con técnicas antigénicas capaces de detectar la fracción libre como la inmunoturbidimetría.

Para completar el estudio de trombofilias se debe determinar también aquellas situaciones que producen un incremento de la actividad coagulante como ocurre con determinadas mutaciones sobre el factor V, la trombina o ante la presencia del anticoagulante lúpico.

El factor V desempeña un papel crucial en la vía final de la coagulación ya que participa en la formación del complejo protrombinasa. La actividad del factor V está regulada por la proteína C que una vez activada se va a encargar de degradar este factor. La resistencia a la proteína C activada implica una falta de inhibición del factor V en presencia de la proteína C activada produciendo una actividad procoagulante elevada. Esta resistencia está causada en la mayoría de los casos por una mutación puntual en el factor V que da lugar a una proteína modificada conocida con el nombre de factor V Leiden que es mucho más resistente a la degradación por parte de la proteína C. El estudio de resistencia a la proteína C activada comienza midiendo el TTPa del paciente en situación basal y tras añadir la proteína C activada recombinante. Si el TTPa tras la adición de la proteína C activada no llega a duplicarse se debe estudiar la presencia del factor V Leiden mediante técnicas de biología molecular encaminadas a encontrar la variante genética responsable de la patología.

También se han descrito situaciones de hipercoagulabilidad asociadas a determinadas variantes en el gen de la protrombina. La presencia de estas variantes debe determinarse mediante métodos de biología molecular como la PCR a tiempo real.

Para completar el estudio de trombofilias se debe descartar la existencia del síndrome antifosfolípido. Este síndrome se considera una enfermedad autoinmune caracterizada por la aparición de manifestaciones clínicas como trombosis o abortos de repetición y la presencia de anticuerpos antifosfolípidicos. Este síndrome se estudia evaluando la presencia de anticoagulante lúpico (AL), anticuerpo anticardiolipina (ACA IgM-IgG) o anticuerpos anti-b2-glicoproteína I. Actualmente no se conoce el mecanismo por el cual estos autoanticuerpos favorecen la aparición de trombos. Para la determinación de los anticuerpos anticardiolipinas y anti b-2-glicoproteína I se utilizan técnicas inmunométricas y un resultado positivo se debe confirmar con una segunda muestra transcurrido un periodo de 12 semanas.

- **Anticoagulante lúpico**

La medición del anticoagulante lúpico es compleja y las guías clínicas recomiendan utilizar dos técnicas diferentes: la prueba del veneno de víbora de Russel diluido y el tiempo de coagulación con sílica. En ambos casos se utiliza un test de cribado en el que se calcula el cociente entre el TTPa del paciente con respecto al de una muestra control. Si este ratio es menor de 1,2 en ambas pruebas se descarta la existencia del anticoagulante lúpico mientras que si es mayor a 1,2 en cualquiera de las determinaciones, se deben realizar pruebas confirmatorias.

Para estas pruebas de confirmación se utilizan las dos metodologías anteriores, pero añadiendo un exceso de fosfolípidos que supera la capacidad de unión de los anticuerpos presentes en el plasma. A continuación, se calcula el ratio confirmatorio, como el cociente entre el TTPa de la muestra y del control. En presencia del anticoagulante lúpico esta ratio debe ser mucho más próximo a 1 porque el exceso de fosfolípidos neutralizaría la presencia de los anticuerpos sobre el TTPa del paciente.

Finalmente, para cada una de las dos metodologías se calcula el ratio normalizado como el cociente entre el ratio obtenido en la prueba de cribado y el ratio en la prueba confirmatoria. Si este cociente es mayor de 1,2 para cualquiera de las dos metodologías, se confirma la presencia del anticoagulante lúpico.

Al igual que en el caso anterior se suele realizar la confirmación del resultado en una segunda muestra obtenida 12 semanas después de la primera.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL:

- Arellano Rodrigo E, Merino González A. Hemostasia práctica en el laboratorio clínico. Barcelona: Comité de Comunicación de la SEQC; 2018.
- 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; 2019.
- Guyton AC, Hall J. Compendio de Fisiología Médica. 12ª ed. Barcelona: Elsevier; 2011.
- Nicoll D; Chuanyi ML; Pignone M, McPhee SJ. Guía de pruebas para diagnóstico. 6ª ed. México DF: McGraw Hill; 2014.
- Ng C, Motto DG, Di Paola J. Diagnostic approach to von Willebrand disease. Blood. 2015 Mar 26;125(13):2029-37.

ESTUDIO DEL ALARGAMIENTO DEL TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADO (TTPa)

Autores: Daniel Gil Alós; Denis Zafra Torres; Nerea Castro Quismondo

Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: TTPa alargado, Déficit de factores, Anticoagulante lúpico

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones en las pruebas básicas de coagulación pueden tener diversas implicaciones, desde artefactos o alteraciones leves con poca transcendencia clínica, hasta ser un signo precoz de enfermedades que pueden resultar una amenaza para la vida y que precisan, por tanto, un diagnóstico precoz para evitar graves complicaciones. Es por ello importante conocer las distintas causas que pueden producir alargamiento del Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa). El presente capítulo se va a centrar en el estudio del TTPa alargado de forma aislada.

FISIOLOGÍA BÁSICA DE LA COAGULACIÓN

• Modelo clásico de la coagulación

La teoría clásica de la coagulación ha dividido ésta en hemostasia primaria y hemostasia secundaria. En la hemostasia primaria, la lesión vascular conlleva una vasoconstricción reactiva así como una disrupción del endotelio con exposición del colágeno subendotelial lo que va a llevar a la unión del Factor von Willebrand (FvW) que mediará la adhesión de las plaquetas circulantes a través de la GPIb. Posteriormente se producirá la activación plaquetaria, liberando desde sus gránulos mediadores como el ADP o prostaglandinas, que van a favorecer la activación y agregación plaquetaria, mediante la unión del fibrinógeno a la GPIIb/IIIa (denominada actualmente integrina $\alpha IIb\beta 3$) de la superficie plaquetaria, dando lugar a la formación del tapón plaquetario.

La hemostasia secundaria se produce de forma paralela a la primaria tras la lesión vascular. Se pueden identificar dos vías de activación: vía extrínseca y vía intrínseca. El inicio de la vía extrínseca ocurre al exponerse el factor tisular (FT) subendotelial lo que va a dar lugar a una activación en cascada de los distintos factores de coagulación. De este modo, el FT se va a unir al FVII activándolo, y acto seguido el FVIIa va a activar al FX, que junto con el FV y el calcio van a formar el complejo activador de la protrombina, activando el FII y dando lugar a la formación de trombina (FIIa) que catalizará la conversión de fibrinógeno a fibrina y su polimerización para la formación del coágulo.

Por otro lado, la activación por la vía intrínseca tiene lugar a través de los factores de contacto, como el quinínogeno de alto peso molecular (HWMK, por sus siglas en inglés) o la precalicreína (PK). Estos producen la activación del FXII, que va a activar al FXI y este último producirá la activación del FIX. El FIXa conllevará la activación del FVIII y, juntos, activarán al FX, continuando por la vía común hasta la

formación de la fibrina como se ha descrito previamente (Figura 1).

Por último, el FXIII, que es activado por la trombina, producirá el entrecruzamiento de los puentes de fibrina aportando una mayor estabilidad y resistencia a la lisis del coágulo.

Este esquema de activación de la coagulación en dos vías (extrínseca e intrínseca) sigue siendo útil para orientar los estudios de coagulación *in vitro*.

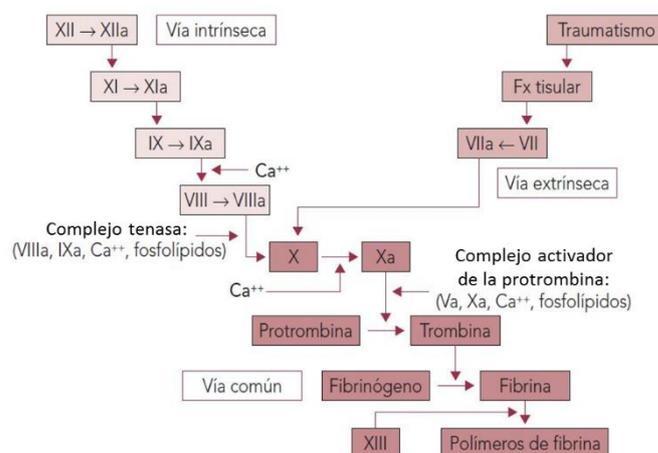


Figura 1. Vías de la coagulación. Adaptado de: Bernardo Gutiérrez, 2018.

• Modelo celular de la coagulación

Hoy en día está más aceptado, en cuanto a fisiología se refiere, el modelo celular de la coagulación. Este es capaz de integrar ambas fases de la teoría clásica (primaria y secundaria) y de explicar la relación temporal entre las vías extrínseca e intrínseca. Divide el proceso de la coagulación en tres fases: la iniciación, donde ejerce un papel fundamental la interacción del FT con el FVII y la adhesión plaquetaria para la formación inicial de una pequeña cantidad de trombina. Posteriormente la amplificación, donde tendrá lugar la activación de las plaquetas y cobrarán importancia el FVIII y el FV. Y por último la propagación, en la cual se van a activar el complejo tenasa y el complejo activador de la protrombina para producir una gran cantidad de trombina (la llamada "explosión de trombina"), que permitirá la formación de grandes cantidades de fibrina así como la estabilización del coágulo, por medio del FXIII y por retroalimentación positiva de los mecanismos previamente descritos.

PRUEBAS BÁSICAS DE LA COAGULACIÓN

• Principios generales

La mayoría de los coagulómetros actuales están basados en métodos de turbidimetría, que se fundamentan en la diferencia de densidad óptica del plasma al ser atravesado por un haz de luz durante el proceso de coagulación. Van a medir el tiempo desde que se desencadena la reacción hasta la formación del coágulo. El resultado se puede expresar en segundos o en forma de ratio (al compararlo con el resultado de un plasma normal).

• Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa)

El TTPa, también conocido como tiempo de cefalina, permite evaluar la vía intrínseca de la coagulación, pero también la vía común. Las principales aplicaciones clínicas son la monitorización de la terapia antitrombótica con heparina no fraccionada (HNF) y la detección de déficits factoriales en la vía intrínseca (VIII, IX, XI, XII).

La determinación del TTPa se lleva a cabo añadiendo el reactivo comercial al plasma e incubándolo a 37°C durante unos minutos para que se produzca la activación de los factores de la vía intrínseca y la vía común. Posteriormente se añade cloruro cálcico que va a catalizar la formación del coágulo y se mide el tiempo desde la adición del calcio hasta la detección del coágulo. El reactivo comercial del TTPa contiene un activador de contacto (caolín, sílica o ácido elálgico) y fosfolípidos (cefalina o tromboplastina parcial) (Figura 2).

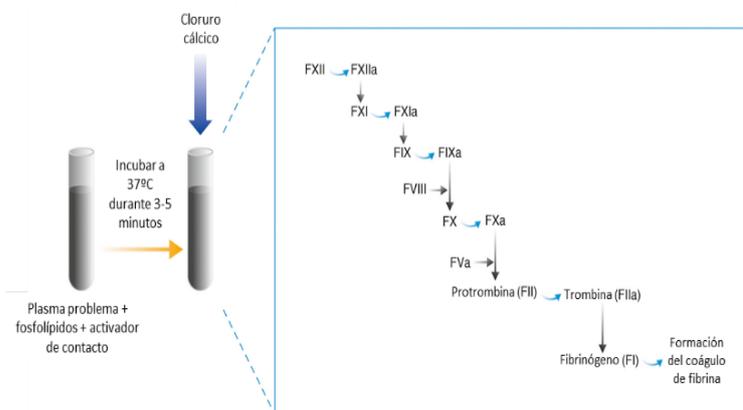


Figura 2. Técnica de realización del TTPa. Adaptado de: Adcock *et al.*, 2018.

Los valores de referencia del TTPa varían entre los distintos laboratorios, porque van a depender del equipo, el anticoagulante, el tubo, el tipo de reactivo y el lote. Además, también existen distintos rangos de normalidad para el TTPa en función de la edad, como se representa en la Tabla 1.

Edad	Límite inferior (s)	Límite superior (s)
> 18 años	20	40
15 días - 1 mes	27,6	45,6
1 - 5 meses	24,8	40,7
6 - 11 meses	25,1	40,7
1 - 5 años	24	39,2
6 - 10 años	26,9	38,7
11 - 17 años	24,6	38,4

Tabla 1. Valores de normalidad para TTPa según la edad. Valores definidos en segundos (s). Adaptado de: Bernardo Gutiérrez, 2018.

• Tiempo de Protrombina (TP)

El tiempo de protrombina (TP) permite evaluar la vía extrínseca de coagulación, y también la vía común. Las principales aplicaciones son la monitorización de la terapia anticoagulante con antagonistas de la vitamina K (como el acenocumarol o la warfarina) y la detección de déficits de factores de la vía extrínseca (II, V, VII, X).

La determinación del TP se produce añadiendo al plasma el reactivo que contiene la tromboplastina, que es una mezcla de factor tisular y fosfolípidos. A esto se le añadirá el cloruro cálcico que va a desencadenar la reacción de coagulación y se medirá el tiempo hasta la formación del coágulo.

Además de su expresión en segundos, el TP también se puede expresar, por medio de comparación con curvas de referencia o ratios de normalidad, en forma de: Actividad de la Protrombina (%), ratio de TP y en INR (validado para el control de la terapia anticoagulante con antagonistas de la vitamina K).

• Tiempo de Trombina (TT)

El tiempo de trombina (TT) permite evaluar la funcionalidad del fibrinógeno así como la presencia de inhibidores de la formación o la polimerización de la fibrina (como inhibidores de la trombina o los productos de degradación de la fibrina, respectivamente).

Para su determinación se añaden pequeñas cantidades de trombina al plasma y se mide el tiempo hasta la formación del coágulo.

• Tiempo de Reptilasa (TR)

Para la determinación del tiempo de reptilasa (TR) se emplea la batroxobina, que es una enzima proteolítica funcionalmente similar a la trombina, derivada del veneno de la víbora *bothrops atrox*. A diferencia de la trombina, no se inhibe por la heparina y los fármacos inhibidores de la trombina (anti-IIa) de modo que su principal utilidad, en combinación con el TT, es la de detectar la presencia de heparina en la muestra (TT alargado con TR normal).

- **Fibrinógeno**

El fibrinógeno derivado permite la cuantificación del fibrinógeno de una manera aproximada, aunque rápida y barata, debido a que se trata de un parámetro indirecto basado en que la cantidad de fibrinógeno en plasma es inversamente proporcional al tiempo que tarda en coagular la muestra. Se estima a través de la amplitud delta del TP (diferencia en la absorbancia al inicio y al final de la reacción).

Para una cuantificación más precisa de los niveles funcionales de fibrinógeno, se puede realizar la técnica de Clauss (o fibrinógeno coagulativo), que consiste en una prueba similar al TT modificado. Sobre una muestra de plasma diluido, con baja concentración de fibrinógeno, se administra una gran cantidad de trombina, se mide el tiempo hasta la coagulación y se extrapola sobre unos valores de referencia poblacional para el cálculo de la concentración. Es un método más preciso ya que en esta situación el factor limitante de la reacción es la concentración de fibrinógeno.

Por último, se puede realizar la cuantificación del fibrinógeno por métodos inmunológicos como los ELISA, pero son métodos más antigénicos que funcionales. Las discrepancias entre estos dos últimos métodos son características de las disfibrinogenemias.

- **Test de mezclas**

Esta prueba consiste en la mezcla de plasma del paciente con plasma normal, manteniendo una proporción 1:1, repitiendo la determinación del parámetro alterado (TP o TTPa) y valorando el grado de corrección del mismo. Esta corrección se debe determinar de manera inmediata tras la mezcla y, en determinadas situaciones, tras incubación durante 2h a 37°C. El plasma normal se puede obtener a partir de un pool de plasmas de pacientes sin alteraciones en el estudio básico de coagulación.

Para valorar el grado de corrección del TTPa en el test de mezclas, se pueden emplear el índice de Rosner:

$$\text{Índice de Rosner (IR)} = \frac{TTPa (M) - TTPa (N)}{TTPa (P)} \times 100$$

Siendo "P" el plasma del paciente, "N" el plasma normal y "M" la mezcla del plasma del paciente y el plasma normal.

En función del resultado:

- IR menor de 12%: Indica corrección, que orienta a déficit factorial.
- IR mayor de 15%: Indica ausencia de corrección, que orienta a presencia de un inhibidor.
- IR entre 12% y 15%: Resulta dudoso y debe ser valorado de forma individualizada.

Existen otros métodos empleados en el estudio de la hemostasia:

- La inmunoturbidimetría, basada en la aglutinación de partículas de látex empleada para la cuantificación de los dímeros-D.
- Los métodos de oclusión, que se utilizan para el estudio global de la función plaquetaria.
- Los métodos cromogénicos, para la dosificación de factores de la coagulación.

- Los métodos mecánicos, como la tromboelastografía (TEG®) y la tromboelastometría rotacional (ROTEM®), que se basan en la determinación de las propiedades viscoelásticas del coágulo para evaluar de forma global la función hemostática.

ESTUDIO DEL TTPa ALARGADO

En el estudio reglado del TTPa alargado de forma aislada, se recomienda:

- 1º. Descartar que se deba a artefactos por alteraciones en la fase preanalítica, fundamentalmente muestra insuficiente o muestra coagulada.
- 2º. Descartar la presencia de heparina u otros fármacos inhibidores en la muestra, ya sea administrado como tratamiento al paciente o por contaminación al extraer la muestra de un acceso vascular heparinizado. Para ello, desde el punto de vista del laboratorio se realizará una determinación del TT que en caso de resultar normal descartaría la presencia de heparina (en la gran mayoría de los casos). Si el TT está alargado, habría que realizar el TR, que si es normal sugiere la presencia de heparina (o fármacos anti-IIa) en la muestra. En caso de TR alargado, sería sugestivo de alteraciones a nivel del fibrinógeno o de hiperfibrinólisis.
- 3º. Una vez descartada la presencia de heparina en la muestra, habría que realizar un test de mezclas como se ha descrito anteriormente. En caso de que el TTPa corrija, hay que considerar un déficit de factores (vía intrínseca o factores de contacto). Si el TTPa no corrige habría que plantearse la presencia de un inhibidor ya sea específico (como los inhibidores contra el FVIII en la hemofilia adquirida) o inespecífico (anticoagulante lúpico).

Ante la presencia de TTPa alargado, especialmente en situaciones de urgencia en las que en la mayoría de los laboratorios no se pueden realizar estudios especiales de coagulación (como la dosificación de factores), es importante valorar la clínica del paciente, investigar la toma de fármacos y los resultados del test de mezclas.

Por tanto, en situaciones de TTPa alargado con un test de mezclas que corrige hay que plantearse en primer lugar un déficit de factores de la vía intrínseca o una enfermedad de von Willebrand (EvW) grave. En los casos de TTPa alargado que no corrige tras el test de mezclas, se debe la presencia de un inhibidor, y tras haber descartado la presencia de fármacos (heparina, anti-IIa como dabigatrán) lo más probable es que se trate de la presencia de anticoagulante lúpico (AL); sin embargo, si se acompaña de clínica hemorrágica hay que tener en cuenta la posibilidad de que se trate de un inhibidor específico (como es el caso de la hemofilia adquirida) (Figura 3).

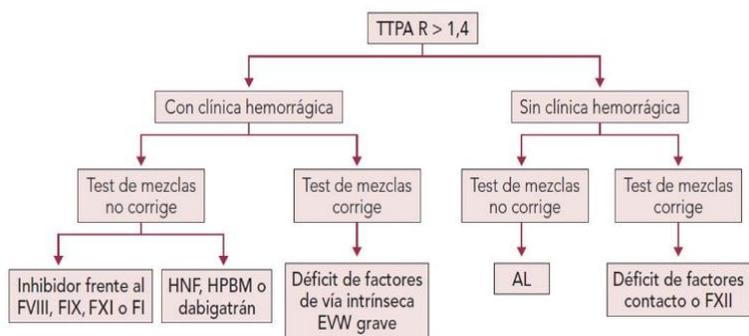


Figura 3. Algoritmo diagnóstico del TTPa alargado en situaciones de urgencia. TTPA R: Ratio de Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado. HNF: Heparina No Fraccionada. HPBM: Heparina de Bajo Peso Molecular. EVW: Enfermedad de Von Willebrand. AL: Anticoagulante Lúpico. FI: Fibrinógeno. Adaptado de: Bernardo Gutiérrez, 2018.

CAUSAS DE TTPa ALARGADO DE FORMA AISLADA

• Causas de alargamiento espurio del TTPa

En primer lugar, es importante descartar que el alargamiento del TTPa se debe a un artefacto por lo que conviene conocer las principales variables preanalíticas que pueden afectar a dicho resultado:

- Muestra insuficiente (Figura 4A). Cuando se llena el tubo debe hacerse hasta la línea de enrase, porque un llenado insuficiente implicará una desproporción entre la cantidad de anticoagulante y el plasma de la muestra a favor del primero, produciendo un falso alargamiento de los tiempos de coagulación.
- Variaciones en el hematocrito (Figura 4B). De modo similar, un hematocrito elevado implicará menor cantidad de plasma en la muestra. En condiciones normales, la proporción de sangre total respecto al anticoagulante es de 9:1 y la del plasma de 5:1. Por lo general, un hematocrito >55%, puede alterar significativamente la proporción y producir un

alargamiento del TTPa (y de otros tiempos). Idealmente habría que ajustar manualmente la cantidad de anticoagulante en el tubo antes de extraer la muestra para evitar este artefacto en los casos con hematocrito elevado ya conocido. Se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

Volumen de anticoagulante (mL) = $100 - \text{hematocrito paciente (\%)} \times \text{Volumen sangre de la muestra} / 595 - \text{hematocrito paciente (\%)}$.

- Tipo de anticoagulante. Se recomienda emplear citrato trisódico dihidratado al 3.2% (frente a la opción de citrato al 3.8%).
- Contaminación con heparina. La presencia de heparina en la muestra como contaminante puede ocurrir al realizar la extracción de un acceso vascular heparinizado. Por este motivo las muestras para estudios de coagulación se deben extraer de venopunción.
- Tiempo desde la extracción hasta el análisis. Es importante que el tiempo desde que la muestra se extrae hasta que se determinan los distintos parámetros sea menor a 4 horas. El TTPa es especialmente sensible a este paso del tiempo debido a la corta vida media del FVIII.
- Muestra coagulada. La presencia de un coágulo en la muestra previo al análisis de la misma puede cursar con alargamiento o acortamiento de los tiempos de coagulación por el consumo de factores o inhibidores de la coagulación.
- Existen otras situaciones en las que, aunque no se produce un alargamiento del TTPa, hay que tener en cuenta su posible efecto sobre este u otros tiempos de la coagulación: hiperbilirrubinemias y hemólisis pueden acortar falsamente los tiempos de coagulación, mientras que hipertrigliceridemias marcadas pueden impedir la determinación de los mismos (por interferencia sobre los métodos ópticos).

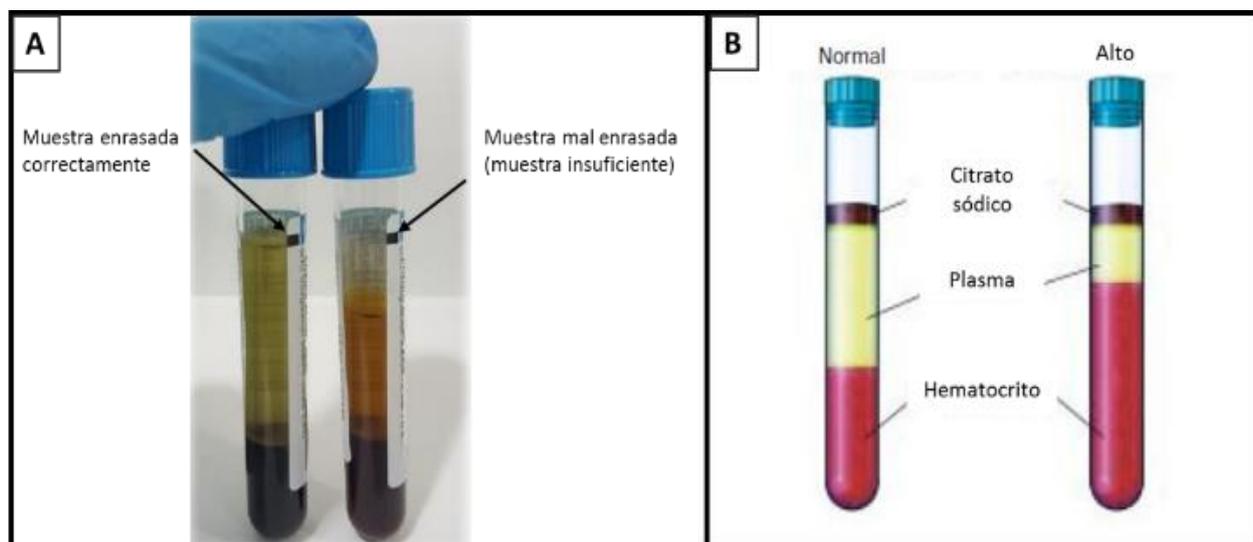


Figura 4. Variables preanalíticas que pueden alargar el TTPa como artefacto. **A.** Llenado insuficiente del tubo de citrato, por debajo de la línea de enrase. Adaptado de: Domínguez J et al, 2018. **B.** Efecto del hematocrito sobre el volumen relativo de anticoagulante en la muestra. Adaptado de: Kamal *et al.*, 2007.

• **Causas de alargamiento real del TTPa**

El siguiente apartado se centra en describir causas de alargamiento aislado del TTPa. No obstante, en la Tabla 2 se muestran causas de alargamiento del TTPa que coexisten con alteraciones en otros tiempos de la coagulación (TP y TT).

TTPa	TP	TT	Posibles diagnósticos
Alargado	Normal	Normal	Déficit de Factor VIII, IX, XI, XII, precalicreína, HMWK, anticoagulante lúpico, inhibidor específico de factor
Alargado	Alargado	Normal	Déficit de múltiples factores (p.ej: hepatopatía, déficit vitamina K, anticoagulantes orales), déficit de factor V, X o II, inhibidor específico de factor
Alargado	Alargado	Alargado	Anticoagulantes, CID, coagulopatía dilucional, hepatopatía, déficit fibrinógeno o disfibrinogenemia, hiperfibrinólisis

Tabla 2. Causas de alargamiento del TTPa. Adaptado de: Pai M, 2017.

Las principales causas de TTPa alargado de forma aislada se describen a continuación:

- Déficit de factores vía intrínseca. Para hallar el factor implicado es preciso la dosificación (o cuantificación) de los mismos, como se detallará más adelante. Estos trastornos se podrían dividir en función de si producen o no clínica hemorrágica:
 1. Con clínica hemorrágica:
 - Déficit de factor VIII o hemofilia A.
 - Déficit de factor IX o hemofilia B.
 - Déficit de factor XI.
 2. En ausencia de clínica hemorrágica:
 - Déficit de factor XII.
 - Déficit de factores de la vía de contacto: PK, HMWK.

Para la dosificación de los factores de la coagulación se pueden emplear los siguientes métodos:

1. Métodos coagulométricos (Figura 5). Se basan en la mezcla del plasma del paciente con un plasma carente

exclusivamente del factor que se pretende dosificar y se determina un tiempo de coagulación (TTPa o TP en función de la vía correspondiente al factor a estudiar). Este tiempo será inversamente proporcional a la concentración de factor en el plasma del paciente. Todos los factores se determinan mediante este método, excepto el FvW, el FVIII cromogénico y el FXIII.

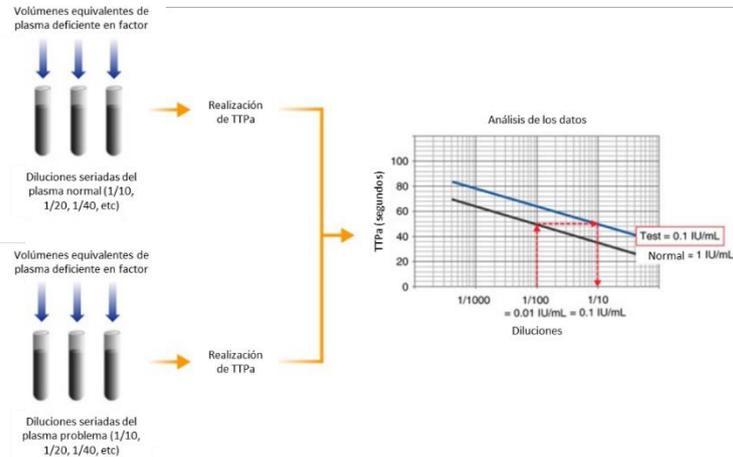


Figura 5. Método coagulométrico para la dosificación de factores de la vía intrínseca. Adaptado de: Marlar et al., 2020.

2. Métodos cromogénicos. Se basan en el empleo de sustratos sintéticos que mimetizan el sustrato natural de algunos factores de la coagulación. Estos sustratos llevan unida una sustancia cromógena que será liberada cuando el factor ejerza su acción proteolítica sobre el sustrato, de modo que se emitirá una cantidad de color que será medida a una longitud de onda determinada. De este modo, a mayor emisión de color mayor cantidad de factor habrá en el plasma.
3. Métodos antigénicos: Basados en las reacciones antígeno-anticuerpo, como las técnicas de ELISA.
 - Presencia de inhibidores adquiridos específicos. Este es el caso de los inhibidores del factor VIII o hemofilia A adquirida, cuando aparecen fuera del contexto de la hemofilia congénita. También existen inhibidores contra el resto de factores de la coagulación, aunque son mucho menos frecuentes. Los inhibidores se detectan por la ausencia de corrección del TTPa en el test de mezclas (aunque puede corregir en los casos con muy bajo título de inhibidor) y, de forma característica, por la presencia de potenciación tras incubación a 37°C durante 2h. Esto es porque a esta temperatura se favorece la unión del inhibidor al factor VIII potenciando así su inhibición.

La cuantificación del título de inhibidor se puede realizar mediante la técnica de Bethesda-Nijmegen que consiste en la mezcla a partes iguales de plasma del paciente con plasma normal (con FVIII aprox. 100%) y su incubación durante 2 horas a 37°C. Tras la determinación posterior del FVIII residual, el título de inhibidor en unidades Bethesda (UB) se extrapolará conociendo que 1 UB se define como la cantidad de inhibidor que neutraliza el 50% del FVIII en plasma normal tras haber sido incubada a 37°C durante 2 horas.

- Anticoagulante lúpico. La presencia de anticoagulante lúpico consiste en la demostración de inhibición no específica de factor, por acción de anticuerpos antifosfolípido. Es por ello que para su determinación se debe demostrar el alargamiento de los tiempos de coagulación empleando reactivos con baja concentración de fosfolípidos (prueba de cribado) y la corrección de los mismos con reactivos con una concentración de fosfolípidos elevada (prueba de confirmación). Habitualmente se emplean 2 técnicas distintas para aumentar la sensibilidad: el tiempo de coagulación con sílica (SCT) y el tiempo de veneno de víbora Russell diluido (dRVVT). La presencia de anticoagulante lúpico, independientemente de la presencia de otros anticuerpos antifosfolípido como anti-cardiolipina (aCL) o anti-β2-glicoproteína-I (aβ2GPI), se relaciona con un aumento del riesgo trombótico.
- Enfermedad de von Willebrand. En este caso el alargamiento del TTPa se produce por degradación del FVIII. En condiciones normales, el FVIII circula unido al FvW a través de su dominio FvW:VIII, lo que evita la degradación del FVIII que en su forma libre tendría una vida media muy reducida. No todas las formas de enfermedad de von Willebrand producen alargamiento del TTPa; dependerá del tipo o de la gravedad de la misma.
- stage factor activity assays in haemophilia A and B. *Eur J Haematol.* 2020;104(1):3-14.
- Pai M. Laboratory evaluation of hemostatic and thrombotic disorders. En: Hoffman R, et al., ed. *Hematology: Basic principles and practice.* 7ª ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018. p. 1922-1931.
- Winter WE, Flax SD, Harris NS. Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Lab Med.* 2017;48:295-313

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Adcock DM, Strandberg K, Shima M, Marlar RA. Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in haemophilia A and B. *Int J Lab Hematol.* 2018;40(6):621-629.
- Bernardo Gutiérrez A. Pruebas básicas de coagulación. En: Soto Ortega I, Álvarez Román MT, ed. *Hemostasia y trombosis en la práctica clínica.* Madrid: Ergon; 2018. p. 25-40.
- Bernardo Gutiérrez A. Pruebas diagnósticas en diátesis hemorrágicas y estados protrombóticos. En: Soto Ortega I, Álvarez Román MT, ed. *Hemostasia y trombosis en la práctica clínica.* Madrid: Ergon; 2018. p. 41-58.
- Domínguez García J, Ferreras Mencía S. Errores preanalíticos en el laboratorio por acción directa del personal de enfermería [Trabajo fin de grado]. Madrid: Universidad Pontificia Comillas; 2018. Disponible en: <https://repositorio.comillas.edu/jspui/bitstream/11531/35905/1/PFG000909.pdf>.
- Kamal AH, Tefferi A, Pruthi RK. How to Interpret and Pursue an Abnormal Prothrombin Time, Activated Partial Thromboplastin Time, and Bleeding Time in Adults. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(7):864-73.
- Kruse-Jarres R *et al.* Acquired hemophilia A: Updated review of evidence and treatment guidance. *Am J Hematol.* 2017;92:695-705.
- Marlar RA, Strandberg K, Shima M, Adcock DM. Clinical utility and impact of the use of the chromogenic vs one-

BLOQUE V

SESIONES DE INMUNOLOGÍA

VASCULITIS ASOCIADA A ANTICUERPOS ANTI-CITOPLASMA DE NEUTRÓFILO

Autores: Eva Barbón Alonso¹; Daniel Párraga García²

¹Servicio de Análisis Clínicos, Complejo Hospitalario de Navarra

²Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Vasculitis, ANCA

INTRODUCCIÓN

Las vasculitis son un conjunto heterogéneo de enfermedades de baja prevalencia caracterizadas por la inflamación de la pared vascular a nivel sistémico. La inflamación se acompaña de obstrucción del flujo sanguíneo y alteraciones en la estructura endotelial que desencadenan estenosis, trombosis y rotura vascular, afectando a los órganos irrigados con una reducción del aporte sanguíneo que puede generar isquemia y necrosis.

El cuadro puede ser idiopático o secundario a diversos factores como infecciones, tratamientos farmacológicos, neoplasias o enfermedades sistémicas. Frecuentemente los pacientes afectados presentan antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes o predisposición genética.

El diagnóstico temprano es esencial para evitar las complicaciones asociadas a la evolución de la patología, sin embargo, la detección temprana es compleja debido a la amplia variabilidad de órganos afectados, sintomatología inespecífica, falta de criterios diagnósticos y desconocimiento de la etiología.

SINTOMATOLOGÍA

Las vasculitis desencadenan síntomas inespecíficos debidos a la afectación vascular generalizada: astenia, anorexia, cefalea, mialgia, artralgia y lesiones a nivel cutáneo, entre las que predomina la púrpura palpable.

Los síntomas específicos de cada tipo de vasculitis son dependientes de la localización de los vasos afectados, los órganos irrigados y la histopatología de la lesión. Es importante caracterizar estos síntomas para poder llevar a cabo una correcta clasificación de la patología.

Desde un punto de vista vascular, los riñones son los órganos más polimórficos, se encuentran irrigados por vasos sanguíneos de múltiples tipos y calibres. Por ello, independientemente del tipo de vaso al que afecte un tipo concreto de vasculitis, los síntomas renales son frecuentes, principalmente la glomerulonefritis.

TIPOS DE VASCULITIS

Se pueden clasificar atendiendo a varios criterios: etiología, patogénesis, tipo de vaso afectado, manifestaciones clínicas, etc.

La clasificación más aceptada es la de la CHCC de 2012 (International Chapel Hill Consensus Conference) en la que se clasifican las vasculitis en función del tamaño del vaso afectado¹.

● Vasculitis de gran vaso

Afectan principalmente a grandes arterias y sus ramas principales. Se expresan en forma de arteritis granulomatosas.

En la CHCC se definen dos tipos de vasculitis de gran vaso con una gran similitud en su sintomatología, diferenciadas principalmente en función de la edad de aparición y las arterias afectadas:

- **Arteritis de Takayasu:** Aparece en individuos con una edad inferior a los 50 años. Los vasos más frecuentemente afectados son la aorta y sus ramas principales.
- **Arteritis de células gigantes o de Horton:** Predomina en individuos mayores de 50 años. Destaca la afectación a nivel de las arterias carótidas y arterias vertebrales, así como sus ramas principales.

● Vasculitis de vaso mediano

Afectan a las arterias principales de los órganos. Frecuentemente se producen aneurismas y estenosis, afectando a los órganos a los que irrigan los vasos dañados. Se dividen en dos tipos:

- **Poliarteritis nodosa:** Arteritis necrotizante con alteraciones a nivel renal (excluyendo la glomerulonefritis) acompañadas de sintomatología a nivel de sistema nervioso, digestivo, cardíaco y afectación cutánea.
- **Enfermedad de Kawasaki:** Se trata de una arteritis asociada a síndrome mucocutáneo y ganglionar de aparición temprana, generalmente durante la infancia o adolescencia. Frecuentemente afecta a las arterias coronarias.

- **Vasculitis de vaso pequeño**

- **Asociadas a anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA):** Caracterizadas por la presencia de ANCA, que juegan un papel fundamental en la lesión de la pared vascular. Se dividen en tres subclases, que se desarrollarán más adelante.

- **Asociadas a inmunocomplejos:** Producidas por depósito de inmunoglobulinas y/o complemento en la pared de los vasos de pequeño calibre. Se clasifican en función del componente predominante en la formación del inmunocomplejo:

1. **Enfermedad por anticuerpos anti-MBG**

(síndrome de Goodpasture): Se caracteriza por el depósito de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la membrana basal glomerular (MBG) que producen glomerulonefritis necrotizante, ocasionalmente acompañada de hemorragias pulmonares. Su aparición se ve favorecida por la presencia de infecciones y la exposición al tabaco.

2. **Vasculitis crioglobulinémica:**

Las crioglobulinas son inmunoglobulinas caracterizadas por precipitar a temperaturas inferiores a 37°C y resolubilizarse cuando la temperatura aumenta de nuevo. Se depositan a nivel vascular produciendo daño por oclusión y mecanismos inmunes. En la mayor parte de los pacientes se asocian a alteraciones hematológicas (mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström o leucemia linfática crónica) o enfermedades autoinmunes. Las principales manifestaciones en este tipo de vasculitis se producen a nivel cutáneo, renal y en el sistema nervio periférico.

3. **Vasculitis urticarial hipocomplementémica**

(HUC): Se asocia con anticuerpos dirigidos contra la fracción C1q del complemento. Cursa con glomerulonefritis, artritis, enfermedad pulmonar obstructiva, inflamación ocular y urticaria. A nivel de laboratorio, se caracteriza por hipocomplementemia.

4. **Vasculitis IgA (púrpura de Schönlein-Henoch):**

También denominada púrpura anafiloide o reumática. Se produce por la acumulación vascular de inmunocomplejos con predominio de IgA. Los síntomas aparecen principalmente en la infancia. Cursa con alteraciones a nivel cutáneo, gastrointestinal y renal, asociadas a artralgias y artritis.

- **Vasculitis de vaso variable:**

La afectación se produce a nivel generalizado, en vasos de diversos tipos y calibres. Se clasifican en dos tipos en función de la sintomatología:

- **Enfermedad de Behçet:** Frecuentemente aparece urticaria recurrente a nivel oral o genital, acompañada de otras manifestaciones cutáneas, oculares, gastrointestinales y/o a nivel del sistema nervioso central.

- **Enfermedad de Cogan:** Se caracteriza por lesiones oculares y disfunción vestibular.

- **Vasculitis de órgano único:**

Se incluyen en este grupo las vasculitis que afectan a un órgano concreto con alteraciones a nivel de diversos tipos de vaso.

Se designan en función del órgano involucrado y el tamaño del vaso afectado, por ejemplo, la vasculitis cutánea de pequeño vaso.

ANTICUERPOS ANTI-CITOPLASMA DE NEUTRÓFILO (ANCA)

Los autoanticuerpos se definen como aquellos anticuerpos dirigidos de manera errónea contra órganos o tejidos del propio organismo.

En condiciones normales, el sistema inmune discrimina entre sustancias extrañas y sustancias propias, generando anticuerpos únicamente hacia las sustancias extrañas. Sin embargo, ocasionalmente el sistema inmunitario desarrolla anticuerpos contra estructuras propias que el organismo reconoce como extrañas, dando lugar a signos y síntomas propios de enfermedades autoinmunes.

Los ANCA son autoanticuerpos, generalmente de tipo IgG, que reaccionan contra antígenos propios localizados en los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos, principalmente mieloperoxidasa (MPO) y proteinasa 3 (PR3).

Las causas de la aparición de ANCA son actualmente desconocidas, aunque se han propuesto una serie de factores como alteraciones a nivel hormonal, exposición a determinados antígenos infecciosos, fármacos o sustancias tóxicas, en combinación con la predisposición genética del paciente.

Se pueden detectar ANCA en individuos sanos, sin embargo, en estos casos se caracterizan por presentar títulos bajos, menor avidez y diversidad; por tanto, desarrollan una capacidad limitada de activar a los neutrófilos

La utilidad principal de su determinación en el laboratorio radica en el diagnóstico de vasculitis de pequeño vaso. Además, los niveles de ANCA se correlacionan con la actividad de la enfermedad y la efectividad del tratamiento, por lo que son útiles en el seguimiento de estas patologías y detección de recidivas.

Se consideran criterios para solicitud al laboratorio de la determinación de ANCA²:

- Glomerulonefritis, en especial rápidamente progresiva.
- Hemorragia pulmonar, principalmente síndromes neuromorrenales.
- Vasculitis cutánea con afectación sistémica.
- Nódulos pulmonares múltiples.
- Enfermedad crónica destructiva de las vías aéreas superiores.

- Sinusitis u otitis crónicas.
- Estenosis traqueal o subglótica.
- Mononeuritis múltiple o neuropatías periféricas.
- Masas retroorbitarias.

Se definen tres tipos principales de ANCA (Figura 1):

- **C-ANCA (citoplasmáticos)**

Caracterizados por presentar una fluorescencia difusa, fina y granulosa en el citoplasma de los neutrófilos.

Los anticuerpos con este patrón reconocen proteínas débilmente catiónicas o neutras, como la PR3.

- **P-ANCA (perinucleares)**

La fluorescencia se visualiza como una fina línea alrededor del perímetro nuclear.

El patrón perinuclear se asocia con la presencia de anticuerpos contra proteínas fuertemente catiónicas, como MPO.

- **X-ANCA (patrón atípico)**

Producido por la unión de los anticuerpos a otras proteínas como catepsina G, lisozima y lactoferrina. Presenta fluorescencia mixta, citoplasmática y perinuclear.

Se trata de un patrón poco frecuente que carece de utilidad para el diagnóstico y clasificación de las vasculitis. Se encuentra en enfermedades inflamatorias a nivel gastrointestinal como colitis ulcerosa.

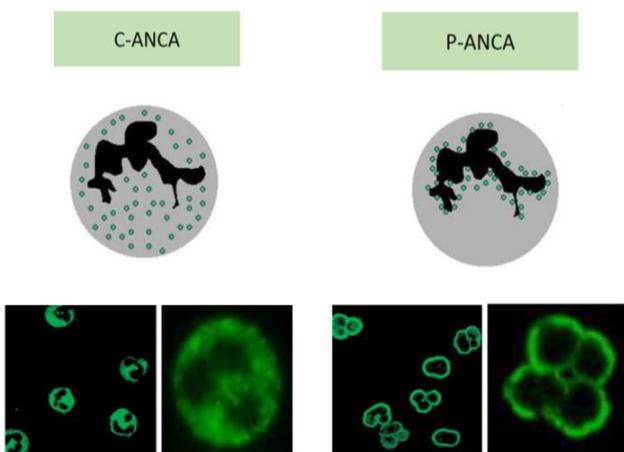


Figura 1. Patrones de ANCA por inmunofluorescencia indirecta. Elaboración propia.

VASCULITIS ASOCIADAS A ANCA (VAA)

Se clasifican en este grupo aquellas vasculitis de carácter necrotizante, caracterizadas por presencia de ANCA, que cursan con inflamación y formación de granulomas a nivel de los vasos de pequeño calibre.

La unión de los ANCA a los neutrófilos produce su activación y adhesión al endotelio, dando lugar a desgranulación y liberación de citoquinas proinflamatorias que generan lesiones a nivel de las células endoteliales en forma de necrosis fibrinoide endotelial, característica de las VAA.

El CHCC de 2012 incluye tres patologías en el subgrupo de VAA: granulomatosis con poliangeítis o granulomatosis de Wegener (GPA), granulomatosis eosinofílica con poliangeítis o síndrome de Churg-Strauss (EGPA) y poliangeítis microscópica (MPA).

La incidencia de las VAA a nivel mundial es de 10-20 casos por cada millón de habitantes al año y es diferente en función de la localización geográfica. EGPA presenta un patrón similar a nivel mundial, GPA destaca en Europa y Estados Unidos, mientras que en Asia predomina la MPA. Además, se han descrito diferencias geográficas en las características de la enfermedad, probablemente debidas a las diferentes condiciones ambientales, hábitos dietéticos y patrón genético.

La edad y el nivel de creatinina en el momento del diagnóstico son los principales factores predictivos de la mortalidad. Además, la afectación cardíaca y la gastrointestinal se relacionan con un peor pronóstico.

En cuanto a sus manifestaciones clínicas, se trata de patologías multisistémicas con una amplia variabilidad en su presentación.

Generalmente comienzan generando una sintomatología inespecífica asociada a la inflamación vascular generalizada: malestar general, anorexia, mialgia y fiebre.

Progresan con edemas y necrosis de las células endoteliales vasculares que desencadenan agregación plaquetaria, trombosis y oclusión de los vasos afectados.

Con el transcurso de la enfermedad aparecen síntomas renales como la glomerulonefritis necrotizante, acompañados de alteraciones pulmonares (hemorragia alveolar), neurológicas (mononeuropatía o polineuropatía periférica), gastrointestinales (úlceras) y cardíacas (miopericarditis).

La afectación renal es el síntoma principal de las VAA debido a que la capacidad de los ANCA para causar daño endotelial predomina en los vasos glomerulares.

En función de la sintomatología se han dividido las VAA en tres entidades principales:

- **Granulomatosis con poliangeítis o granulomatosis de Wegener (GPA)**

Se define como una inflamación granulomatosa de la pared vascular o en la región perivasculare que se desencadena en torno a la quinta o sexta década de vida.

Su presentación clínica cursa con alteraciones a nivel del tracto respiratorio superior, pulmonar y renal.

Las manifestaciones a nivel otorrinolaringológico incluyen úlceras en la mucosa oral, rinorrea sanguinolenta, epistaxis y otitis media serosa.

A nivel pulmonar destaca la aparición de nódulos con tendencia a la cavitación o infiltrados persistentes que pueden ser detectados mediante pruebas de imagen. La sintomatología derivada de las alteraciones pulmonares incluye hemoptisis y dolor torácico.

Frecuentemente la afectación renal se expresa en forma de glomerulonefritis necrotizante caracterizada por proteinuria y microhematuria.

Otros síntomas, aunque de baja frecuencia, aparecen a nivel ocular, cutáneo y neurológico.

Generalmente se asocia a un patrón C-ANCA con especificidad anti-PR3.

- **Granulomatosis eosinofílica con poliangeítis o síndrome de Churg-Strauss (EGPA)**

Aparece en pacientes diagnosticados de asma, atopía o rinitis alérgica recurrentes, principalmente de mediana edad.

La sintomatología comienza con un cuadro similar al de la patología desencadenante, por lo que frecuentemente la EGPA se diagnostica como asma o rinitis en los estados iniciales.

Con el transcurso de la enfermedad se desarrolla eosinofilia en sangre periférica.

La sintomatología predomina a nivel pulmonar con infiltrados, hemorragia alveolar y pleuritis, afectando en menor medida a riñones, corazón, tracto gastrointestinal y piel.

Generalmente presentan un patrón P-ANCA con anticuerpos específicos contra MPO.

- **Poliangeítis microscópica (MPA)**

Se diagnostica principalmente en pacientes entorno a la sexta década de vida.

Su manifestación más frecuente es la nefropatía en forma de glomerulonefritis necrotizante rápidamente progresiva.

Puede cursar con síntomas cutáneos, neuropatía periférica y alteraciones pulmonares (capilaritis pulmonar). Estos pacientes presentan generalmente P-ANCA con especificidad anti-MPO.

Los criterios de clasificación de estas vasculitis se encuentran definidos por el *American College of Rheumatology* (Tabla 1), con una sensibilidad diagnóstica de 82-88% y especificidad de 92-99%.

Deben cumplirse dos o más criterios para el diagnóstico de GPA, cuatro o más en caso de EGPA y al menos tres en MPA.³

La CHCC recomienda añadir al nombre de la patología el prefijo de ANCA para indicar la reactividad específica de este tipo de anticuerpos, de manera que se denominen ANCA-MPO (específicos para la mieloperoxidasa) o ANCA-PR3 (específicos para la proteinasa 3).

Debido al variado espectro clínico de estas enfermedades se propone clasificarlas en cuatro estadios en función del órgano afectado y la gravedad de la sintomatología:⁴

- **Enfermedad localizada:** La afectación se restringe a un único órgano, sin aparición de síntomas constitucionales. Se define por presentar niveles de creatinina sérica inferiores a 1,7 mg/dL.
- **Enfermedad sistémica precoz:** Similar a la enfermedad localizada, pero con síntomas constitucionales o enfermedad multiorgánica sin deterioro funcional de los órganos afectados. Los niveles de creatinina se encuentran en rangos de normalidad.

Granulomatosis con poliangeítis o granulomatosis de Wegener (GPA)	Granulomatosis eosinofílica con poliangeítis o síndrome de Churg-Strauss (EGPA)	Poliangeítis microscópica (MPA)
<ul style="list-style-type: none"> • Inflamación oral o nasal: Úlceras o secreción nasal purulenta o sanguinolenta. • Radiografía de tórax: Nódulos, infiltrados no migratorios o cavitación. • Sedimento urinario: Microhematuria o presencia de cilindros hemáticos. • Biopsia: Infiltrados granulomatosos en la pared vascular. 	<ul style="list-style-type: none"> • Historia de asma. • Eosinofilia > 10%. • Alteraciones neurológicas: Mononeuropatía o polineuropatía. • Radiografía de tórax: Infiltrados pulmonares migratorios o transitorios. • Sinusitis aguda o crónica. • Biopsia: Acumulación de eosinófilos extravasculares o vasculitis eosinofílica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de peso: Al menos de 4 kg desde el inicio de la patología. • Libido reticularis: Patrón reticular moteado en la piel. • Dolor o sensibilidad testicular. • Mialgias o debilidad muscular. • Alteraciones neurológicas: Mononeuropatía o polineuropatía. • Presión arterial diastólica > 90 mmHg. • Creatinina > 1,5 mg/dL. • Virus de la Hepatitis B. • Aneurismas u oclusiones vasculares. • Biopsia: Leucocitos en pared vascular.
Cumplimiento de ≥ 2 criterios	Cumplimiento de ≥ 4 criterios	Cumplimiento de ≥ 3 criterios

Tabla 1. Criterios diagnósticos de los diferentes tipos de VAA definidos por el *American College of Rheumatology*. Adaptado de: Koldingsnes W *et al*, 2008.

- **Enfermedad generalizada sin afectación grave:** Se define por una afectación multiorgánica acompañada de síntomas constitucionales. Los órganos implicados se encuentran ligeramente dañados. La creatinina sérica es inferior a 5,7 mg/dL.
- **Vasculitis renal grave:** Se trata de un estadio con riesgo vital inmediato que cursa con insuficiencia renal rápidamente progresiva, hemorragia pulmonar grave con insuficiencia respiratoria o afectación grave de cualquier otro órgano. La insuficiencia renal rápidamente progresiva se caracteriza por niveles de creatinina sérica superiores a 5,7 mg/dL.

DIAGNÓSTICO DE VAA

Las VAA representan un importante reto diagnóstico debido a la afectación multiorgánica, su escasa prevalencia y la baja especificidad de su sintomatología.

El diagnóstico de sospecha se establece basándose en las manifestaciones clínicas y antecedentes familiares y personales del paciente.

En caso de sospecha se recomienda realizar un estudio incluyendo pruebas de laboratorio con determinación de ANCA. La presencia de ANCA en suero del paciente es necesaria, aunque insuficiente para el diagnóstico de vasculitis.

En caso de resultado positivo, se realizarán pruebas complementarias de imagen y, en última instancia, biopsia de los órganos afectados con el fin de confirmar el diagnóstico de vasculitis, su etiología y la extensión de la afectación.

• Pruebas de laboratorio

La analítica debe incluir hemograma, perfiles hepático y renal, parámetros inflamatorios (velocidad de sedimentación glomerular y proteína C reactiva), urianálisis y determinación de ANCA.

Las alteraciones analíticas más comunes en pacientes con VAA incluyen anemia normocítica normocrómica, eosinofilia periférica superior a un 10% (en caso de EGPA), aumento de los marcadores inflamatorios, hematuria, proteinuria y presencia de cilindros hemáticos o hialinos en el sedimento óptico de orina.

Se recomienda realizar un estudio serológico que incluya los virus de la hepatitis B y C y el virus de la inmunodeficiencia humana, ya que pueden tratarse de factores desencadenantes de VAA.

La determinación de los niveles de ANCA se basa en pruebas de detección de autoanticuerpos.

La metodología empleada para el cribado es la inmunofluorescencia indirecta (IFI). En caso de resultado positivo, será necesaria la confirmación con ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) o inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) y fijación con formalina.

- IFI

Es la técnica más utilizada para la detección de cualquier tipo de autoanticuerpo (Figura 2).

Las placas utilizadas para la IFI son diferentes en función del autoanticuerpo que se pretenda detectar, en caso de los ANCA se utilizarán placas de vidrio recubiertas con neutrófilos aislados de sangre periférica humana fijados con etanol.

El etanol produce la liberación de las proteínas de los gránulos primarios de los neutrófilos. Las moléculas de PR3 se distribuirán de manera homogénea en el citoplasma mientras que las de MPO, de carácter fuertemente catiónico, se reorganizan en la periferia del núcleo por atracción de la carga negativa del DNA.

La IFI se basa en una secuencia de reacciones inmunológicas en las que intervienen varios elementos: neutrófilos, ANCA en el suero del paciente y un reactivo que contiene anticuerpos anti-IgG humana marcados con un fluoróforo, generalmente isotiocianato de fluoresceína (FITC).

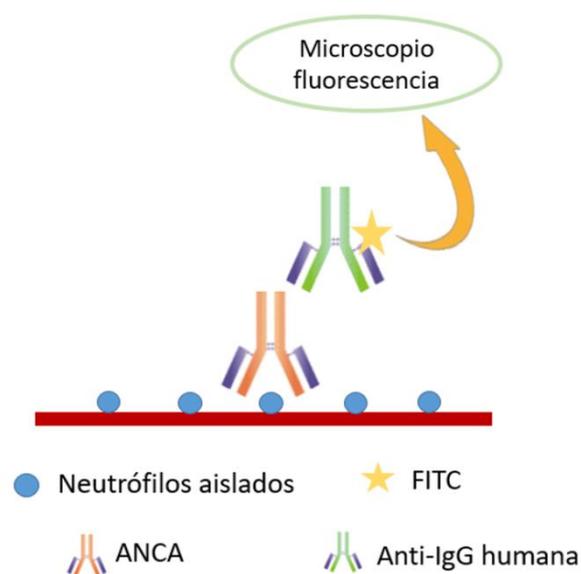


Figura 2. Representación esquemática de la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Elaboración propia.

Se trata de un procedimiento complejo dividido en varias etapas:

1. **Incubación con el suero del paciente:** Las placas de vidrio previamente preparadas se incuban con el suero del paciente durante 30 minutos. En caso de presencia de ANCA en suero, se producirá la adhesión a los neutrófilos de la placa.
2. **Primer lavado:** Elimina los restos de suero del paciente que pueden actuar como interferentes.
3. **Incubación con el reactivo:** Se añade el reactivo con los anti-IgG humana marcados. Estos anticuerpos se unirán a los ANCA.

- Segundo lavado:** Elimina los anticuerpos del reactivo que no se hayan unido. En pacientes con ANCA en suero, los anticuerpos marcados se mantendrán unidos después del lavado.
- Visualización:** Se utiliza un microscopio de epifluorescencia.

El resultado de la IFI será negativo en caso de que no se visualice fluorescencia y positivo si aparece fluorescencia, ya que en los pacientes con ANCA en suero se visualiza el FITC de los anti-IgG.

En esta visualización se caracteriza el patrón de ANCA que presenta el paciente. C-ANCA en caso de observar un patrón citoplasmático y P-ANCA si se detecta un patrón nuclear.

El inconveniente de esta técnica es la dificultad para su estandarización, se encuentra sujeta a una gran variabilidad interobservador, por lo que se requiere de personal con elevada formación y experiencia para evitar diferencias entre laboratorios.

- ELISA

El ELISA es un inmunoensayo en fase sólida que necesita cuatro componentes (Figura 3):

- Anticuerpo primario:** El anticuerpo que se pretende detectar y cuantificar. En este caso, el anticuerpo primario será el autoanticuerpo presente en el suero del paciente.
- Antígeno específico:** El ELISA nos permite conocer la especificidad antigénica de los ANCA detectados mediante IFI.

Como antígenos específicos utilizaremos MPO o PR3, la unión a uno de ellos determinará la selectividad de los ANCA.

- Anticuerpo secundario conjugado:** Se utilizan anticuerpos anti-IgG humana que se unirán a los ANCA, en caso de presencia en el suero del paciente.

Estos anticuerpos se conjugan con un enzima, generalmente peroxidasa o fosfatasa alcalina.

- Sustrato:** Sustancia que reacciona con el enzima unido al anticuerpo generando una reacción cuantificable, generalmente colorimétrica.
- Equipo de lectura:** Sistema que permita la lectura del resultado de la reacción enzimática de modo que cuantifique la cantidad de anticuerpo presente en la muestra.

Se utilizan placas con pocillos recubiertos con concentraciones previamente conocidas de los antígenos purificados: MPO o PR3.

El suero del paciente es introducido en el pocillo y se incuba, permitiendo la interacción entre los anticuerpos presentes en el suero del paciente y los antígenos.

Los anticuerpos que no se hayan unido al pocillo y el resto de proteínas del suero son eliminados mediante un lavado de la placa. Tras este lavado, solamente permanecerán unidos aquellos anticuerpos que se unan a los antígenos específicos.

Se añade un reactivo que contiene los anticuerpos anti-IgG humana marcados con el enzima. Estos anticuerpos secundarios se unirán al anticuerpo primario en caso de presencia en el suero del paciente.

Se realiza un segundo lavado, con el fin de eliminar los anticuerpos secundarios libres, y se añade una solución con un sustrato cromogénico específico del enzima utilizado. Este sustrato cambiará de color en contacto con el enzima de forma directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos en la muestra.

El resultado de esta técnica nos aportará dos tipos de información. Por una parte, permite conocer la especificidad de los anticuerpos, en función de si se fijan a un pocillo recubierto con MPO (anti-MPO) o con PR3 (anti-PR3). Por otra parte, permite la cuantificación de estos anticuerpos mediante la reacción colorimétrica producida al añadir el sustrato cromogénico.

El ELISA es el ensayo más utilizado para el diagnóstico y seguimiento de patologías autoinmunes.

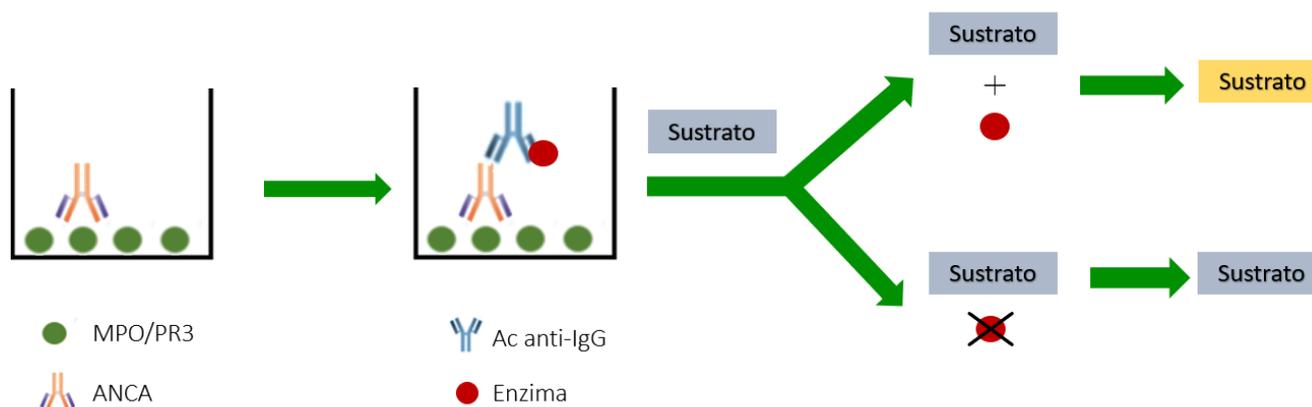


Figura 3. Representación esquemática del ensayo de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA). Elaboración propia.

- CLIA

Se utiliza como alternativa al ELISA.

Se trata de una técnica basada en la quimioluminiscencia en la que se utilizan tres componentes (Figura 4):

1. **Partículas paramagnéticas:** Previamente recubiertas de MPO o PR3.
2. **Anticuerpo primario:** El autoanticuerpo presente en la muestra del paciente.
3. **Anticuerpos secundarios marcados:** Anticuerpos anti-IgG humana marcados con isoluminol.

Se pone en contacto el reactivo que contiene partículas paramagnéticas recubiertas de MPO o PR3 con el suero del paciente y se incuba a 37°C. Se magnetiza para activar las partículas paramagnéticas, permitiendo que los autoanticuerpos presentes en la muestra se fijen a sus antígenos específicos. Se realiza un primer lavado para eliminar interferentes.

Se introduce en el mismo pocillo un conjugado de anticuerpos anti-IgG humana marcados con isoluminol. Estos anticuerpos se unirán a los ANCA presentes en el suero del paciente.

La lectura se producirá tras realizar un segundo lavado. En caso de presencia de ANCA en el suero del paciente, los anti-IgG permanecerán unidos. El isoluminol presente en la muestra emitirá una señal luminosa que puede ser medida en unidades relativas de luz (URL). Las URL detectadas son directamente proporcionales a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra.

Al igual que el ELISA, el CLIA permite identificar la especificidad antigénica de los anticuerpos detectados mediante IFI y cuantificarlos. Se trata de una alternativa al ELISA, pero su utilización concomitante no aporta beneficios en el diagnóstico de vasculitis.

Será el propio laboratorio el que, en función de sus características y objetivos decida la utilización de ELISA o CLIA.

- Fijación con formalina

Se trata de una IFI convencional en la que el etanol utilizado para fijar los neutrófilos se sustituye por formalina.

Su utilidad diagnóstica reside a la homología existente entre los patrones P-ANCA y ANA (anticuerpos antinucleares) al utilizar una IFI con fijación en etanol.

Ambos se adhieren al núcleo en una IFI convencional ya que el antígeno natural de los ANA es el propio núcleo y el de P-ANCA la MPO. Fisiológicamente la MPO se encuentra en los gránulos citoplasmáticos, sin embargo, al tratarse con etanol presenta una gran tendencia a migrar hacia la región nuclear, proporcionando el característico patrón perinuclear.

La utilidad de la formalina reside en que se trata de un solvente orgánico que reduce la atracción entre la MPO y las cargas negativas del DNA nuclear. Al utilizar formalina conseguimos que los gránulos con MPO se mantengan en su lugar de origen, el citoplasma.

De esta forma, los anticuerpos P-ANCA se fijarán al citoplasma, mientras que los ANA se mantendrán en el núcleo.

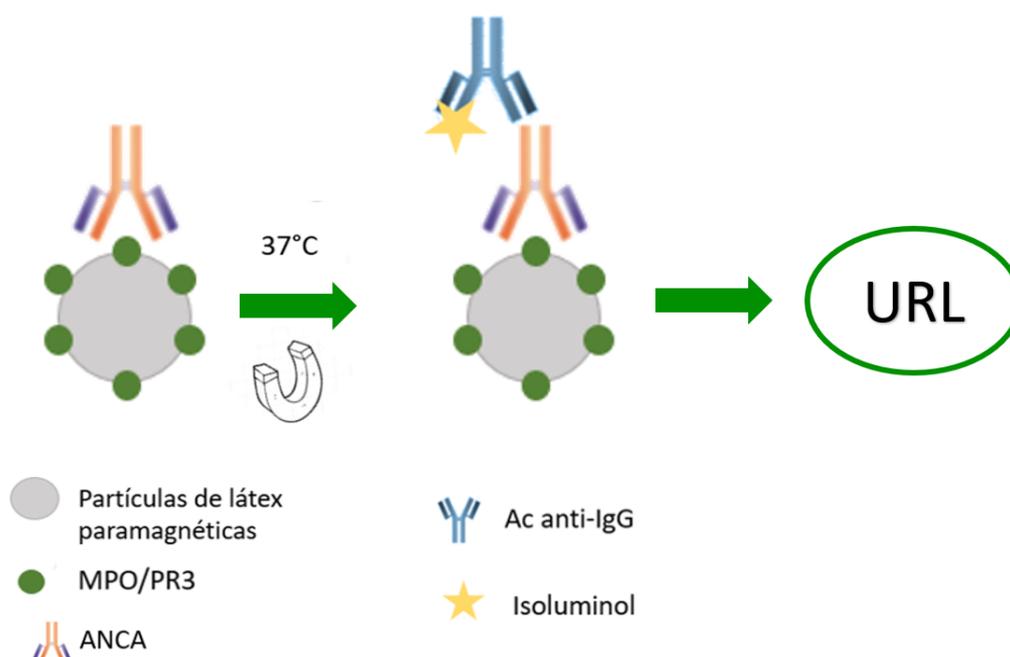


Figura 4. Representación esquemática del inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA). Elaboración propia.

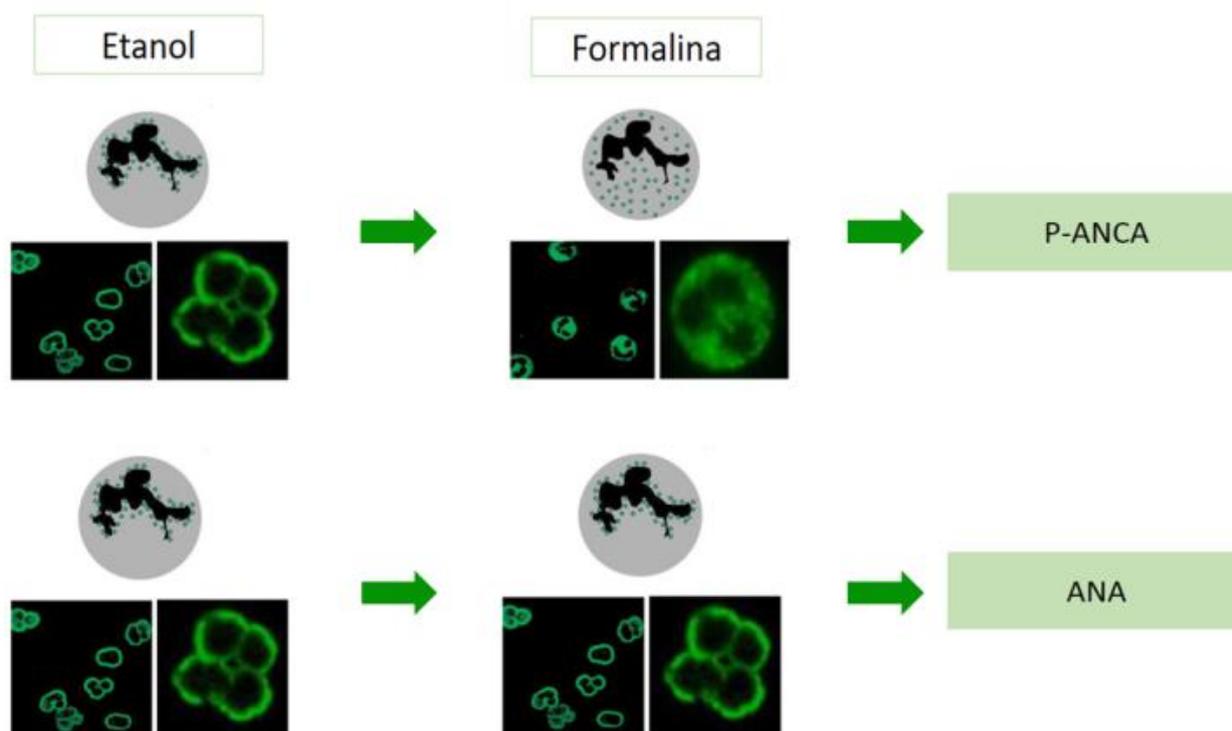


Figura 5. Imagen de los patrones P-ANCA y ANA en IFI con fijación con etanol en comparación con formalina. Elaboración propia.

Por tanto, un patrón perinuclear en etanol que se convierta en citoplasmático en formalina sugiere la presencia de P-ANCA mientras que un patrón nuclear en ambos sustratos hace sospechar de presencia de ANA (Figura 5).

- **Pruebas de imagen**

Es posible utilizar diversas pruebas de imagen para confirmar la afectación orgánica.

La radiografía de tórax y la tomografía computarizada permiten la detección de alteraciones a nivel pulmonar sugestivas de VAA (nódulos o infiltrados pulmonares).

En función de la sintomatología propia del paciente se utilizarán otras técnicas como electromiografía, electrocardiograma o resonancia magnética.

- **Diagnóstico histológico**

El diagnóstico definitivo de las VAA se basa en criterios histológicos.

Se recomienda realizar la biopsia de los órganos en los que se sospeche afectación, en caso de que existan varios órganos afectados se comenzará por el que se encuentre más dañado.

Generalmente la biopsia más realizada en estos casos es la renal en la que se consideran hallazgos sugestivos del diagnóstico de VAA la lesión glomerular con formación de semilunas, necrosis fibrinoide y glomeruloesclerosis, acompañados de infiltrados inflamatorios periglomerulares.

Una vez confirmado el diagnóstico del paciente y prescrito un determinado tratamiento, se recomienda realizar revisiones periódicas en las que se evalúa la remisión o reactivación de la patología y la utilidad del tratamiento.

En el seguimiento de la patología se utilizan técnicas que permiten cuantificar los niveles de ANCA: titulación mediante IFI, ELISA o CLIA.

La titulación de anticuerpos por IFI se lleva a cabo realizando diluciones seriadas de la muestra de suero del paciente. En cada una de las diluciones se verifica microscópicamente la presencia o ausencia de fluorescencia. El título de ANCA se corresponde con la dilución máxima a la que se mantiene la fluorescencia.

TRATAMIENTO

El tratamiento de inducción se basa en prednisona combinada con otros inmunosupresores.

Históricamente se ha utilizado ciclofosfamida como inmunosupresor principal en estos casos, sin embargo, debido a su elevada toxicidad, la tendencia actual se orienta hacia su sustitución por azatioprina, metotrexato o micofenolato de mofetilo.

El tratamiento de inducción se utiliza durante 6-24 semanas en función de la gravedad de la patología. En ese punto comienza la administración de tratamiento de mantenimiento utilizando el mismo inmunosupresor que en el tratamiento de inducción, eliminando la prednisona de la pauta.

El tratamiento de mantenimiento se ajustará de manera periódica en función de los resultados de la cuantificación de ANCA. En caso de mantenerse en niveles bajos se mantiene o se reduce la dosis, mientras que en caso de aumento se debe aumentar la dosis o plantearse una modificación en el inmunosupresor utilizado.

CONCLUSIONES

- Las vasculitis son patologías potencialmente graves, pero de baja frecuencia y con una sintomatología poco específica, por lo que su diagnóstico temprano es complejo.
 - Las vasculitis se clasifican según los criterios de la CHCC de 2012 en función del tamaño de vaso afectado.
 - Las VAA afectan principalmente a vasos de pequeño calibre. Para su diagnóstico se determina la presencia de ANCA en el suero del paciente.
 - Es importante determinar el tipo de ANCA y su especificidad antigénica para poder clasificar de manera correcta el tipo de VAA.
 - La IFI es la técnica de elección para la detección de ANCA en el suero del paciente. Una IFI positiva se confirmará con ELISA o CLIA y fijación con formalina.
 - El seguimiento de la actividad de la patología y la efectividad del tratamiento se realiza mediante la titulación de ANCA por IFI o cuantificación mediante ELISA o CLIA.
 - El tratamiento de elección es prednisona combinada con otro inmunosupresor. En el tratamiento de mantenimiento se elimina la prednisona de la pauta.
- Hernández Ramírez DF, Cabiedes J. Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Reumatol Clin.* 2010;6(3):173-7.
 - Lilia E, Cazate C, Fonf JA. Algunas especificaciones sobre las vasculitis. *Medisan.* 2016;20(11):2395-409.
 - Pulido-Pérez A, Avilés-Izquierdo JA, Suárez-Fernández R. Vasculitis cutáneas. *Actas Dermosifiliogr.* 2012;103(3):179-91.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 2012;65(1):1-11.
2. Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol.* 1999;111:507-13.
3. Koldingsnes W, Nossent H.C. Epidemiology of ANCA associated vasculitis. *Norsk Epidemiology.* 2008;18(1):37-48.
4. Cid MC, Solans R. *Avances en vasculitis sistémicas.* Barcelona: Marge Médica Books; 2012.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Amengual Guedán MJ, Mozo Avellaneda L, Rodríguez Hernández C. *Protocolos de diagnóstico inmunológico de enfermedades autoinmunes.* Barcelona: Elsevier; 2014. p. 49-53.
- Ceballos Bolaños C. *Estudio clínico, analítico y pronóstico de las vasculitis ANCA asociadas diagnosticadas en el HUMS en los últimos 10 años [Trabajo fin de grado].* Zaragoza: Universidad; 2017. Disponible en: <https://deposita.unizar.es/record/33702>
- Cid MC, Solans R. *Avances en vasculitis sistémicas.* Barcelona: Marge Médica Books; 2012.

BCMA SOLUBLE COMO BIOMARCADOR NO INVASIVO EN NEOPLASIAS DE CÉLULAS B

Autores: Laura Díez Alonso; Laura Rubio Pérez; Marina Gómez Rosel

Unidad de Inmunoterapia del Cáncer, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Biomarcador, Mieloma múltiple, Inmunoterapia

INTRODUCCION

La expresión de BCMA (*B-cell maturation antigen*, TNFRSF17 o CD269) en membrana se regula mediante la escisión de su porción extracelular al medio en forma soluble, un proceso irreversible mediante el cual se controla la cantidad y actividad de estas moléculas¹ (Figura 1). BCMA participa en la proliferación y supervivencia de células B y células plasmáticas mediante la unión a sus ligandos BAFF y APRIL.

BCMA se libera directamente por acción de una γ -secretasa (Figura 1), proteasa expresada de manera ubicua que actúa en la porción transmembrana. La mayoría de los sustratos de esta enzima tienen un ectodominio largo, que necesita ser procesado previamente por acción de otras proteasas. BCMA fue identificada como la primera proteína de membrana que es directamente liberada por γ -secretasa sin procesamiento previo² debido a su corto dominio extracelular (54 aminoácidos). Algunos sustratos de γ -secretasa (ej. Notch) liberan un fragmento activo C-terminal intracelular que induce señalización, aunque la mayoría se degradan rápidamente después del corte. Para BCMA, todavía no se ha identificado función del fragmento C-terminal intracelular.

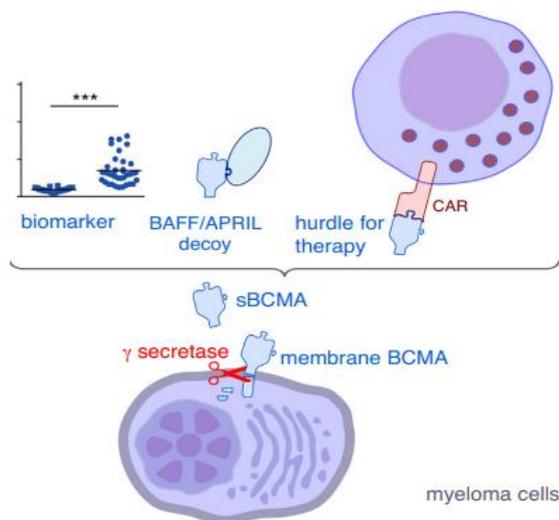


Figura 1. Liberación de BCMA de membrana en forma soluble. Tomado de: Meinel *et al.*, 2021.

Dada la expresión restringida de BCMA en células B maduras y plasmáticas, representa una diana potencial para tratar las neoplasias de línea B (mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica). Se están desarrollando multitud de estrategias terapéuticas dirigidas a este antígeno (anticuerpos monoclonales, desnudos o conjugados con fármacos [ADC], anticuerpos biespecíficos, terapias CAR-T)

BCMA SOLUBLE COMO BIOMARCADOR

BCMA es un receptor de la familia TNFR presente en línea B madura y se desprende de la membrana por un proceso espontáneo. Debido a sus niveles elevados en el suero de pacientes con neoplasias malignas de células B, podría ser un biomarcador sanguíneo prometedor para monitorizar pacientes con estas neoplasias incluyendo mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom o leucemia linfocítica crónica.

El rápido recambio de BCMA en la sangre lo convierte en un marcador ideal para controlar el curso de la enfermedad, de hecho, BCMA puede determinar los cambios en el estado clínico mucho más rápidamente que otros marcadores utilizados actualmente.

Los pacientes con inmunodeficiencias primarias como son la agammaglobulinemia ligada a X (XLA) e inmunodeficiencia variable común (CVID) que muestran un número reducido de células B y plasmáticas tienen también niveles reducidos de sBCMA³.

Muchos enfoques terapéuticos de base inmunitaria dirigidos a BCMA se encuentran ahora en desarrollo clínico o preclínico (anticuerpos monoclonales, ADC, BiTEs y células CAR-T). BCMA circulante puede interferir con la eficacia de estos tratamientos. El bloqueo de su liberación en forma soluble con inhibidores γ -secretasa podría aumentar la eficacia de estos tratamientos. Es un marcador para determinar la dosificación óptima de estos fármacos, así como reducir los niveles de sus efectos bloqueadores para mejorar la eficacia de estos tratamientos.

- sBCMA representa un nuevo biomarcador y dada su corta vida media, permite una determinación más rápida de los cambios en el estado clínico que los parámetros utilizados en la actualidad.
- sBCMA es un marcador pronóstico y puede usarse para detectar pacientes en recaída y resistentes al tratamiento.
- sBCMA se puede utilizar para seguir a pacientes con mieloma múltiple no secretor.
- El tratamiento dirigido anti-BCMA puede verse afectado por los niveles de BCMA circulante. Los inhibidores de γ -secretasa permiten reducir la liberación de BCMA mejorando la eficacia de los tratamientos dirigidos a BCMA.

- Es responsable de la inmunodeficiencia observada en pacientes con mieloma múltiple y con inmunodeficiencias primarias de células B (XLA, CVID) debido a que interfiere en la unión de los ligandos BAFF y APRIL, por lo que tiene el potencial de usarse para diagnosticar y seguir a estos pacientes.
- **Valor pronóstico y de seguimiento en mieloma múltiple (MM)**
 - BCMA está elevado en el suero de pacientes con MM y sus niveles se correlacionan con el porcentaje de células plasmáticas en la médula ósea⁴ siendo mayor en aquellos con MM activo seguido de MM latente (smoldering) y gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS).
 - Los niveles de sBCMA también se correlacionan con el estado clínico de los pacientes, al comparar a los pacientes en remisión completa con aquellos con respuesta parcial y son más bajos entre los pacientes que responden al tratamiento en comparación con aquellos con enfermedad progresiva.
 - Los niveles de sBCMA se correlacionan positivamente con los niveles de proteína M y dada la vida media más corta de BCMA soluble (24-36 h) en comparación con la IgG (3-4 semanas)⁵, es más fácil observar cambios rápidos en el estado clínico de los pacientes, lo que permite evaluar mejor el tratamiento, así como determinar la aparición de resistencias y retirar antes un tratamiento ineficaz que pueda deteriorar al paciente de cara a la próxima línea de tratamiento.
 - La determinación de cadenas ligeras libres en suero (sFLC) se ha convertido en parte de las pruebas de laboratorio de rutina para el diagnóstico de MM, particularmente importante en pacientes con amiloidosis que tienen carga tumoral muy baja y la proteína M a menudo no es detectable en la sangre u orina. La vida media de la cadena ligera libre en suero (sFLC) es ≤ 6 h por lo que los cambios teóricamente se podrían detectar incluso más rápido que con sBCMA, pero la relación entre las concentraciones séricas y la excreción urinaria de 24 horas de es difícil debido a la variabilidad entre pacientes, y diferencias en las tasas de filtración glomerular. Los niveles de sBCMA, en cambio, son independientes de la función renal⁶.
 - En pacientes con MM con baja carga tumoral o enfermedad no secretora, sFLC no se puede medir, sBCMA en cambio sí se puede detectar. Se ha demostrado que los cambios en los niveles de sBCMA se correlacionan con los cambios en el porcentaje de células plasmáticas en médula ósea

y los hallazgos en la tomografía por emisión de positrones (PET).

Actualmente no existe un kit de ELISA aprobado para el uso diagnóstico de sBCMA como biomarcador, todos los kits disponibles comercialmente son solo para uso en investigación, se trata de ELISA tipo sándwich que detectan BCMA soluble por medio de un anticuerpo de captura o primario y un anticuerpo de detección o secundario.

BCMA soluble se presenta por tanto como un biomarcador prometedor pues se encuentra significativamente elevado en el suero de humanos con MM con cantidades mínimas de suero requerido para su evaluación (4 μ L) y es estable a temperatura ambiente durante meses y, por lo tanto, sería un ensayo económico para el seguimiento de pacientes con neoplasias y enfermedades de células B y plasmáticas. Su corta semivida en sangre en relación con la semivida de la IgG, lo hace además especialmente útil para determinar los cambios en el estado clínico más rápidamente entre los pacientes que reciben nuevos tratamientos en comparación con los niveles de paraproteína IgG.

- **pBCMA en leucemia linfocítica crónica (LLC)**

- Para determinar si los niveles de pBCMA podrían usarse como marcador de la actividad de la enfermedad en la LLC, un análisis de muestras seriadas demostró que los niveles de pBCMA entre los pacientes con LLC eran significativamente más altos en comparación con las muestras obtenidas de sujetos sanos⁷ y que se correlacionaba con cambios en su estado clínico. También se observó una fuerte correlación con los niveles de microglobulina beta 2 y el recuento de glóbulos blancos.
- Los marcadores pronósticos actuales de LLC son el estado mutacional de la cadena pesada de la región variable de la inmunoglobulina (IgHV), el % de homología con el gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina de la línea germinal expresado en las células malignas y la expresión de ZAP-70. Los pacientes con células de LLC con genes IgHV no mutados (> 98% de homología con la línea germinal) tienen un pronóstico desfavorable y estos también tenían niveles de pBCMA significativamente más altos en comparación con aquellos pacientes con genes IgHV mutados⁸. En cuanto a ZAP-70, pacientes con ZAP-70 expresado en más del 20% de sus células tumorales tienen un peor pronóstico. Estos también tenían niveles más altos de pBCMA en comparación con los pacientes con una menor proporción de células con expresión de ZAP-70.

- **sBCMA en otras neoplasias de células B**

- En pacientes con macroglobulinemia de Waldenström, también se ha visto que los niveles de sBCMA están elevados y se correlacionan con el estado clínico⁹. También se ha demostrado que

BCMA se expresa en células de linfoma de Hodgkin y está vinculada a la proliferación y supervivencia de células tumorales, sin embargo, no se han encontrado niveles de sBCMA elevados en estos pacientes.

- **sBCMA en enfermedades autoinmunes**

- Se han observado niveles más altos de sBCMA en pacientes con LES que en controles sanos¹⁰.
- También entre pacientes con neuroborreliosis se correlacionaron con niveles de IgG en el sistema nervioso central. No se demostró que los pacientes con esclerosis múltiple tuvieran niveles elevados de sBCMA en la sangre, pero sí en el líquido cefalorraquídeo.
- En el caso de pacientes con trastornos autoinmunes, se están desarrollando tratamientos basados en el activador transmembrana y modulador del calcio e interactor del ligando de ciclofilina (TACI) y anti-BAFF y anti-APRIL, ligandos de BCMA, para tratar eficazmente a estos pacientes¹¹.

- **sBCMA en pacientes con inmunodeficiencia primaria de anticuerpos**

- Estos pacientes presentan reducción en sus células B y células plasmáticas con un déficit de producción de anticuerpos. Los pacientes con dos tipos comunes específicos de inmunodeficiencia, inmunodeficiencia común variable (CVID) y agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA), mostraron niveles muy bajos de sBCMA en comparación con los sujetos control de la misma edad y sexo.
- Dentro del subconjunto CVID, aquellos con cualquier complicación crónica o enteropatía también tenían niveles de sBCMA significativamente más bajos que aquellos sin estas complicaciones.
- En cuanto al % de células B o los niveles de IgA, IgG o IgM, no se observó correlación con sBCMA.

- **sBCMA y terapia dirigida en neoplasias malignas de células B**

- BCMA soluble circulante puede reducir potencialmente la eficacia de las terapias dirigidas por BCMA, y estudios recientes respaldan esta posibilidad a partir de estudios clínicos en curso¹².
- En presencia de concentraciones clínicamente relevantes de sBCMA, la eficacia anti tumoral en mieloma múltiple del anticuerpo biespecifico anti BCMA-anti CD3 BI 836909 se redujo y solo el 20%

de las células de MM murieron (en contraste con el 50% previamente eliminado a la misma concentración sin BCMA soluble), lo que supone que pueden ser necesarias dosis más altas de agente terapéutico, ya que es probable que BCMA circulante en la sangre de los pacientes con MM se una y neutralice estos fármacos¹³.

- Se está evaluando la combinación de terapias dirigidas anti-BCMA con inhibidores de γ -secretasa para aumentar la eficacia en varios ensayos.

ESTIMACIÓN DE UN RANGO DE REFERENCIA PARA BCMA EN SUERO

Los niveles de BCMA en suero se correlacionan con las células plasmáticas en las biopsias de médula ósea (Figuras 2 y 3), el estado clínico de los pacientes (Figura 4) y los niveles de paraproteína M y SFLC (cadenas ligeras libres).

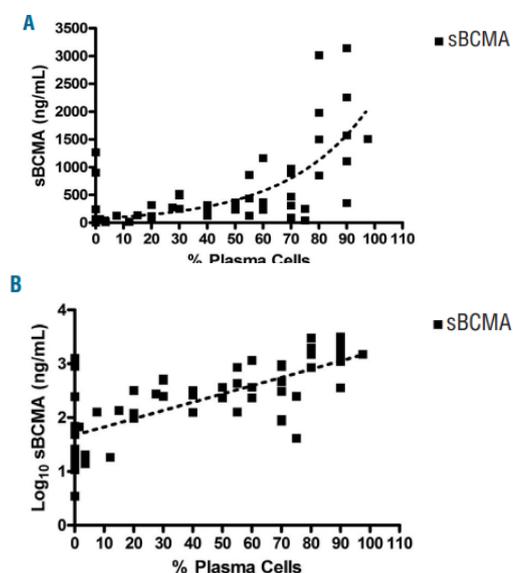


Figura 2 y 3. Correlación sBCMA con % de células plasmáticas en médula ósea. Tomado de: Ghermezi *et al.*, 2017.

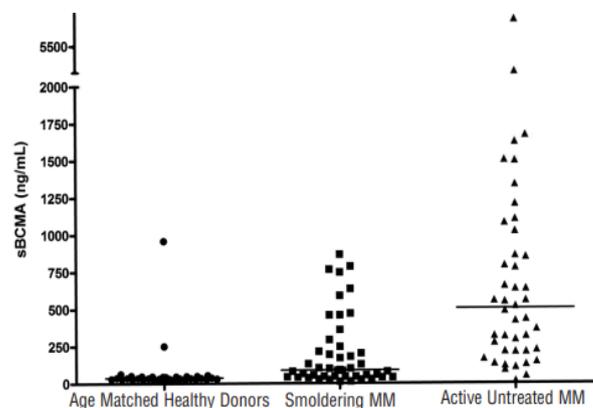


Figura 4. Correlación sBCMA con el estado clínico de los pacientes. Tomado de: Ghermezi *et al.*, 2017.

Además, los niveles de sBCMA son independientes de la función renal y de otros biomarcadores pronósticos de MM como son la edad, $\beta 2$ microglobulina, hemoglobina, y el daño óseo.

Hay múltiples estudios en marcha para establecer un rango de referencia de BCMA en suero que permita distinguir pacientes sanos de aquellos con enfermedad latente o activa, o en respuesta al tratamiento frente a aquellos resistentes.

BÚSQUEDA DE RECEPTORES SOLUBLES COMO BIOMARCADORES

- Ciertas proteínas de membrana son liberadas al medio en forma soluble mediante la escisión de su porción extracelular. Este mecanismo es responsable de la modulación de múltiples procesos celulares fisiológicos y patológicos.
- Estas proteínas de membrana en el medio soluble pueden suponer una fuente adicional de biomarcadores accesibles y no invasivos en diferentes procesos fisiológicos y patológicos así como potenciales dianas terapéuticas¹⁴.
- Actualmente no existe una base de datos experimentalmente validada para esta serie de marcadores. Además de las proteínas que experimentan procesos de secreción, otras pueden ser directamente liberadas por escisión de su porción extracelular de la membrana. Esto incluye moléculas de adhesión celular, factores de crecimiento, citoquinas, receptores celulares que son liberadas en su totalidad en forma soluble o bien fragmentos de las mismas. El proceso de escisión se ha visto relacionado con la regulación de

varias patologías (degeneración, inflamación, cáncer) o procesos fisiológicos (proliferación, diferenciación o migración), dichas moléculas han de cumplir una serie de requisitos para poder sufrir este mecanismo de escisión.

- Existen bases de datos de escisión¹⁵⁻¹⁷ como MEROPS, PMAP-SubstrateDB y HPRD que se han desarrollado como recursos de información sobre proteasas y sus sustratos identificados, una parte de ellos pueden no ser validados o fisiológicamente relevantes así como aún no se hayan registrado y anotado en estas bases de datos.
- La base de datos SheddomeDB fue diseñada para la identificación de proteínas de membrana liberadas al medio soluble a través de la escisión proteolítica. Basándose en una revisión exhaustiva de la literatura sobre estudios de eventos de escisión de proteínas de membrana, se identificaron un total de 401 proteínas validadas, entre las cuales 199 de ellas aún no se habían registrado en las bases de datos actuales (Figura 5). Para cada proteína validada experimentalmente, se proporciona un informe completo basado en referencias bibliográficas, incluida la maquinaria de escisión y la función o enfermedades relacionadas. Las referencias cruzadas a otros recursos, como la evidencia publicada en los datos del secretoma y los registros existentes de sitios de escisión de proteasas, también se incluyen. Además, la herramienta de predicción publicada anteriormente ShedP se incorporó a SheddomeDB. ShedP es un método computacional desarrollado para predecir eventos de escisión de proteínas de membrana basado en la secuencia proteica, lo que permite evaluar la probabilidad de este evento en proteínas de membrana aún no registradas.

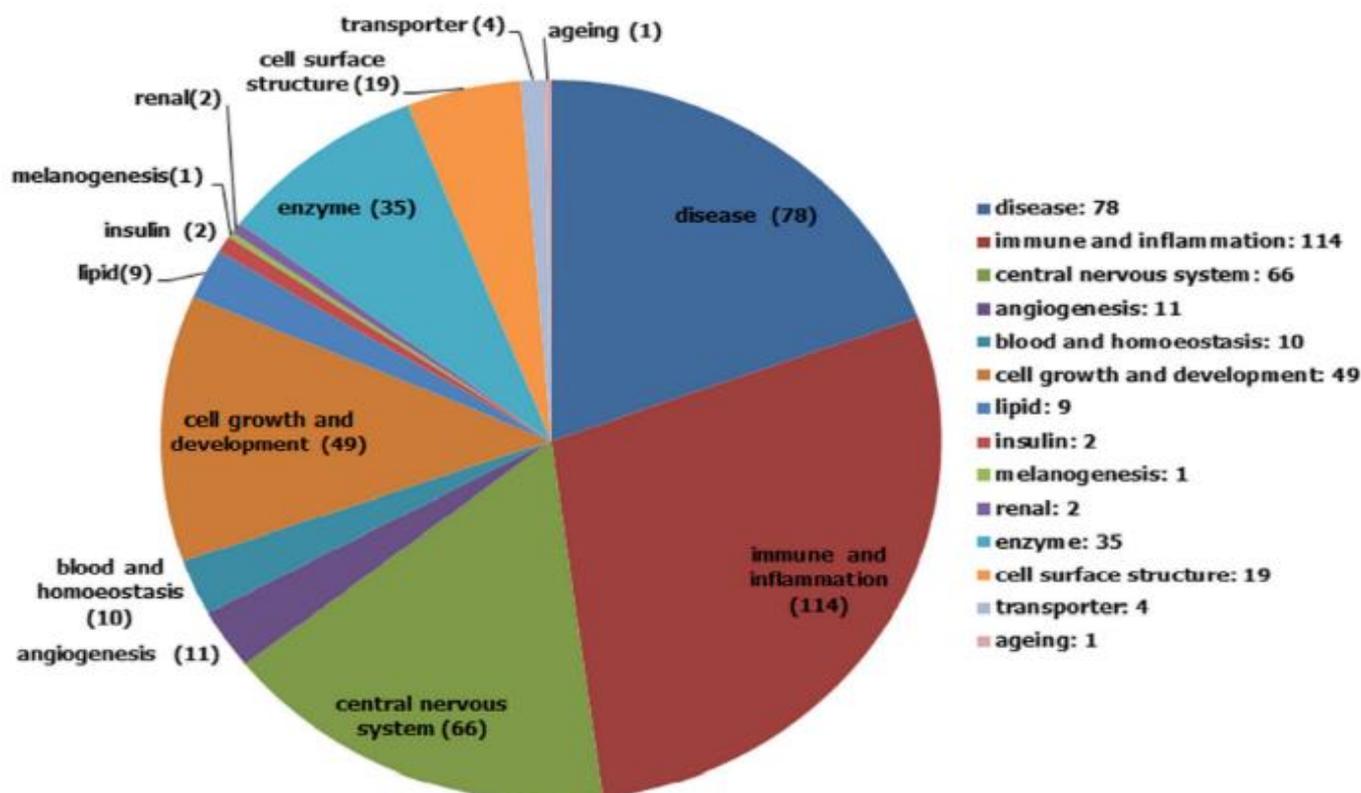


Figura 5. Clasificación de 401 proteínas de membrana escindidas identificadas según su función. Tomado de: Tiene WS, 2017.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Lichtenthaler SF. Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals—hardware, concepts, and recent developments. *EMBO J*. 2018 Aug 1;37(15):e99456.
2. Laurent SA, Hoffmann FS, Kuhn PH, Cheng Q, Chu Y, Schmidt-Suppran M, et al. γ -Secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells. *Nat Commun*. 2015 Jun 11;6:7333.
3. Maglione PJ, Li M, Sánchez E, et al. Reduced serum levels distinguish patients with primary antibody deficiency. Poster session presented at: Genetic dysregulation in immunodeficiencies and immune-mediated diseases. 100th Annual Meeting of the American Association of Immunologist; 2016 May 13-17; Seattle, WA.
4. Sánchez E, Li M, Kitto A, Li J, Wang CS, Kirk DT, et al. Serum B-cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival. *Br J Haematol*. 2012;158:727-38.
5. Jagannath S. Value of free light chain testing for the diagnosis and monitoring of monoclonal gammopathies in hematology. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2007;7(8):519-23.
6. 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:e538-e548.
7. Udd KA, Rassenti LA, David ME, et al. Plasma B-cell maturation antigen levels are elevated and correlate with disease activity in patients with chronic lymphocytic leukemia. Poster session presented at: 57th ASH Annual Meeting and Exposition; 2015, Dec 10-13; San Diego, CA.
8. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK, et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1848-54.
9. Ardanyan S, Meid K, Udd KA, et al. Serum levels of B-cell maturation antigen are elevated in Waldenström's macroglobulinemia patients and correlate with disease status and conventional M-protein and IgM levels. Poster session presented at: 57th ASH Annual Meeting and Exposition; 2015 Dec 10-13; San Diego, CA.
10. Steri M, Orrù V, Idda ML, Pitzalis M, Pala M, Zara I, et al. Overexpression of the cytokine BAFF and autoimmunity risk. *N Engl J Med*. 2017;376:1615-26.
11. Samy E, Wax S, Huard B, Hess H, Schneider P. Targeting BAFF and APRIL in systemic lupus erythematosus and other antibody-associated diseases. *Int Rev Immunol*. 2017;36:3-19.
12. Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, Rose JJ, Raffeld M, Yang S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2013;19:2048-60.
13. Hipp S, Tai YT, Blanset D, Deegen P, Wahl J, Thomas O, et al. A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis in vitro and in vivo. *Leukemia*. 2017;31:1743-51.
14. Makridakis M, Vlahou A. Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *J Proteome*. 2010;73(12):2291-305.
15. Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44(D1):D343-350.
16. Igarashi Y, Heureux E, Doctor KS, Talwar P, Gramatikova S, Gramatikoff K, Zhang Y, Blinov M, Ibragimova SS, Boyd S, et al. PMAP: databases for analyzing proteolytic events and pathways. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37(Database issue):D611-618.
17. Prasad TS, Kandasamy K, Pandey A. Human protein reference database and human proteopedia as discovery tools for systems biology. *Methods Mol Biol*. 2009;577:67-79.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Ghermezi M, Li M, Vardanyan S, Harutyunyan NM, Gottlieb J, Berenson A, et al. Serum B-cell maturation antigen: a novel biomarker to predict outcomes for multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2017 Apr;102(4):785-95
- Jew S, Bujarski S, Soof C, Chen H, Safaie T, Li M, et al. Estimating a normal reference range for serum B-cell maturation antigen levels for multiple myeloma patients. *Br J Haematol*. 2021 Mar;192(6):1064-7.
- Meinl E, Krumbholz M. Endogenous soluble receptors sBCMA and sTACI: biomarker, immunoregulator and hurdle for therapy in multiple myeloma. *Curr Opin Immunol*. 2021 Aug;71:117-23.
- Sánchez E, Tanenbaum EJ, Patil S, Li M, Soof CM, Vidisheva A, et al. The clinical significance of B-cell maturation antigen as a therapeutic target and biomarker. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018 Apr;18(4):319-29.
- Tien WS, Chen YT, Wu KP. SecretePipe: a screening pipeline for secreted proteins with competence to identify potential membrane-bound shed markers. *J Proteome Res*. 2013 Mar 1;12(3):1235-44.
- Tien WS, Chen JH, Wu KP. SheddomeDB: the ectodomain shedding database for membrane-bound shed markers. *BMC Bioinformatics*. 2017 Mar 14;18(Suppl 3):42.

