



Libro de Sesiones de los
Laboratorios Clínicos 2023

CLIN12LAB

Editores:

Celia Amil Manjón

Pilar Duarte García

Ángel Camilo López Regueiro

Sergio Real Gutiérrez

Esther Carolina Tamayo Hernández

Fernando Calvo Boyero



SaludMadrid

Hospital Universitario
12 de Octubre

Editores de este volumen:

Celia Amil Manjón, Pilar Duarte García, Ángel Camilo López Regueiro, Sergio Real Gutiérrez,
Esther Carolina Tamayo Hernández, Fernando Calvo Boyero

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>

I.S.B.N.: 978-84-09-61076-1

Madrid (España), 2024



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 2023

Editores

Celia Amil Manjón

Pilar Duarte García

Ángel Camilo López Regueiro

Sergio Real Gutiérrez

Esther Carolina Tamayo Hernández

Fernando Calvo Boyero

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

LISTADO DE EDITORES

Celia Amil Manjón
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid
Email: celia.amil@salud.madrid.org

Pilar Duarte García
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid
Email: pilar.duarte@salud.madrid.org

Ángel Camilo López Regueiro
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid
Email: angelcamilo.lopez@salud.madrid.org

Sergio Real Gutiérrez
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid
Email: sergio.real@salud.madrid.org

Esther Carolina Tamayo Hernández
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid
Email: esthercarolina.tamayo@salud.madrid.org

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

LISTADO DE COLABORADORES

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

LISTADO DE AUTORES *(por orden alfabético)*

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

María Concepción Burgos Ballester
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Jesús Cabanes Madrid
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

José Miguel Comino Cáceres
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Aitor Delmiro Magdalena
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

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 y Hemoterapia
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

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

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

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

Beatriz Hidalgo Calero
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

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

Raquel Victoria Melgares de Aguilar Marco
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Belén Ontañón Nasarre
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

Sara Peral 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

María Poza Santaella
Servicio de Hematología y Hemoterapia
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

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

María del Valle Romero Real
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

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

José Manuel Sánchez Zapardiel
Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos
Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

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

PRÓLOGO

El laboratorio clínico constituye una de las bases esenciales de la medicina, proporcionando una importante herramienta para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades. Sus áreas de conocimiento abarcan desde las diferentes metodologías de análisis hasta la interpretación de los resultados y su correlación con la clínica de los pacientes, haciendo de los especialistas del laboratorio clínico profesionales altamente cualificados en diversas áreas de conocimiento.

En este libro esperamos mostrar al lector los principales avances y aspectos teóricos que forman parte de las diferentes disciplinas del laboratorio. Para ello, presentamos una recopilación de las sesiones clínicas que realizan regularmente estos profesionales, como parte fundamental de su desarrollo profesional y científico. En cada uno de estos capítulos el lector podrá encontrar una fuente de información que comprende desde los fundamentos básicos hasta las novedades más recientes de este área de conocimiento.

Esperamos que estas páginas sean de utilidad a los especialistas de laboratorio clínico y también a otros profesionales sanitarios y estudiantes de ciencias de la salud. Que supongan una base para la reflexión e inspiración profesional y fomenten la innovación en la actividad asistencial y el trabajo diario.

Los editores

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BLOQUE I SESIONES DE BIOQUÍMICA CLÍNICA	13
MANEJO DEL SÍNDROME DE DISTRÉS AGUDO DE LA COVID-19 EN CUIDADOS INTENSIVOS José Miguel Comino Cáceres, Belén Ontañón Nasarre y Daniel Párraga García	14
PERFILES TIROIDEOS DISCORDANTES. “SECRECIÓN INAPROPIADA DE TSH” Adrián González Quintana, Silvia Díaz Díaz, Ilenia Liria González	19
MONITORIZACIÓN TERAPÉUTICA DE AGENTES ANTIFÚNGICOS Julia Sanz Gómez, Sara Peral García, Jon Sánchez Munárriz	25
PRUEBAS FUNCIONALES EN LA PATOLOGÍA HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIA: ENFERMEDAD DE CUSHING Y ACROMEGALIA – Ilenia Liria González, Silvia Díaz Díaz, Adrián González Quintana	31
HE4: MARCADOR TUMORAL EN EL CÁNCER DE OVARIO Sara Peral García, Adrián González Quintana, Silvia Díaz Díaz	35
ORGANIZACIÓN PREANALÍTICA – Sara Peral García; José Miguel Comino Cáceres.....	41
ORGANIZACIÓN POSTANALÍTICA – María Concepción Burgos Ballester; Fernando Calvo Boyero	50
REMODELADO ÓSEO: APLICACIÓN DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS Maialen Palomino Alonso, Ilenia Liria González	57
EL COBRE: ASPECTOS BIOLÓGICOS GENERALES Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS Jesús Cabanes Madrid, Ángel Camilo López Regueiro, Daniel Párraga García.....	65
MALABSORCIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO Celia Amil Manjón, Pilar Duarte García, Aitor Delmiro Magdalena	70
EL LABORATORIO EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS PORFIRIAS Ylenia Pérez Arnaiz, Ilenia Liria González, Silvia Díaz Díaz	76
ESTUDIO DEL LÍQUIDO ARTICULAR EN EL LABORATORIO CLÍNICO María del Valle Romero Real, Laura Carrasco Parrón	82
ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS Raquel Victoria Melgares de Aguilar Marco, Irene González Martínez	89
LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO – Ylenia Pérez Arnaiz*, Maialen Palomino Alonso*, Alba Fernández del Pozo.....	98
BLOQUE II SESIONES DE CALIDAD	102
TIPOS DE LIDERAZGO APLICADOS A INSTITUCIONES SANITARIAS Daniel Párraga García, Jose Miguel Comino Cáceres, Belén Ontañón Nasarre	103
SISTEMAS DE CALIDAD. NORMAS DE CERTIFICACIÓN Y DE ACREDITACIÓN Y MODELOS NO NORMATIVOS: JOINT COMMISSION, EFQM, NORMAS ISO. INDICADORES DE GESTIÓN CLÍNICA Daniel Párraga García, Belén Ontañón Nasarre, Jose Miguel Comino Cáceres.	110
BLOQUE III SESIONES DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.....	116
CITOGENÉTICA – Irene González Martínez	117
TÉCNICAS BÁSICAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS Jesús Cabanes Madrid, José Manuel Sánchez Zapardiel, Beatriz Hidalgo Calero.....	124

BLOQUE IV SESIONES DE HEMATOLOGÍA.....	129
APLICACIONES DEL FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA EN EL LABORATORIO DE HEMATIMETRÍA – Daniel Gil Alós, María Poza Santaella.....	130
CITOMORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA HEMATOLÓGICA DE LOS HEMATÍES. PATOLOGÍAS DE LA SERIE ROJA – Fernando Calvo Boyero, Pilar Duarte García, Sandra Gómez Rojas.....	137
BLOQUE V SESIONES DE MICROBIOLOGÍA.....	150
HEMOCULTIVOS – Maialen Palomino Alonso, Carmen Alhena Reyes Ruiz	151
PARÁSITOS DE INTERÉS CLÍNICO: PROTOZOOS Y HELMINTOS Jesús Cabanes Madrid, Pilar Duarte García, Laura Carrasco Parrón.....	159

* Ambos autores han participado de forma equitativa en la redacción del texto

BLOQUE I

SESIONES DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

MANEJO DEL SÍNDROME DE DISTRÉS AGUDO DE LA COVID-19 EN CUIDADOS INTENSIVOS

Autor: José Miguel Comino Cáceres, Belén Ontañón Nasarre y Daniel Párraga García

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

Palabras clave: COVID-19, Cuidados Intensivos, Síndrome de distrés respiratorio agudo.

INTRODUCCIÓN

La aparición del virus SARS-CoV-2 produjo en los humanos una enfermedad que fue denominada COVID-19. El propio nombre del virus hace referencia al distrés respiratorio agudo que puede producir.

El rápido incremento de la incidencia de COVID-19 produjo una dramática sobrecarga de los Sistemas de Salud de todo el mundo. España no fue una excepción, sobre todo en las primeras oleadas se vivieron situaciones muy especiales a nivel asistencial. Todo esto obligó a los profesionales y a los centros a adaptarse con inmediatez para atender de la mejor manera posible a los numerosos pacientes. Muchos de estos pacientes tenían graves necesidades de salud con un alto riesgo de mortalidad.

En las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) se realiza la asistencia de los pacientes que requieren soporte vital avanzado. Una parte importante del soporte vital es el mantenimiento de los procesos de oxigenación e intercambio de gases que es precisamente la principal causa de mortalidad de la infección por SARS-CoV-2.

El objetivo de este tema es dar a conocer a los profesionales del laboratorio clínico nociones de lo que se puede hacer por los pacientes con distrés respiratorio agudo en las unidades de cuidados intensivos a nivel respiratorio y relacionarlo con la aportación del laboratorio para el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes.

SÍNDROME DE DISTRÉS RESPIRATORIO AGUDO

- Fisiopatología

• Alveolo pulmonar

Es la unidad funcional del pulmón donde se produce el intercambio de gases. El cuerpo humano dispone de entre 300-500 millones de alveolos. Tienen forma de saco y en conjunto abarcan una superficie de intercambio de gases entre las dos fases (la atmósfera y la sangre) de entre 40 y 80 metros cuadrados.

Para que los gases pasen de una fase a la otra, es necesario que la pared celular que las separa sea muy fina y por tanto muy frágil ante determinados factores etiológicos como las infecciones virales.

Los alveolos están íntimamente unidos a una red de capilares sanguíneos. La pared celular del alveolo dispone de determinadas células especializadas en las que habría que destacar:

Neumocitos tipo I. Tapizan el 95 % de la lámina basal.

Neumocitos tipo II: Segregan surfactante pulmonar que forma una película que cubre el epitelio.

Macrófagos: Células inmunocompetentes especializadas en fagocitar partículas procedentes del aire aspirado.

• Factores que influyen en la difusión de gases

Los principales gases que difunden a través de los alveolos son el oxígeno (desde el exterior a la sangre) y el dióxido de carbono (desde la sangre al exterior). Los factores que influyen son:

1. Gradiente

La oxigenación de la sangre (difusión de oxígeno) se produce a favor de gradiente (desde un medio con mayor presión de oxígeno a otro con menor presión). Esto hace que el proceso se realice pasivamente, sin necesidad de transportadores ni consumo de ATP. El gradiente podría definirse como la diferencia de presiones (presión de O₂ del aire inspirado menos la presión de O₂ de la sangre).

La presión parcial del O₂ en el aire inspirado depende fundamentalmente de la fracción inspiratoria de O₂ (FiO₂), que en el aire atmosférico es del 21%, y de la presión del aire, que si es atmosférico es de 760 mmHg, a nivel del mar.

La presión parcial de O₂ es la presión del oxígeno gaseoso disuelto en la sangre. Se determina por técnicas electroquímicas en equipos de gasometría. Si por ejemplo el valor es de 102 mmHg y el del aire inspirado es 150 mmHg, el gradiente es de 48 mmHg. Este gradiente es uno de los principales factores que influye en la difusión de gases (Figura 1).

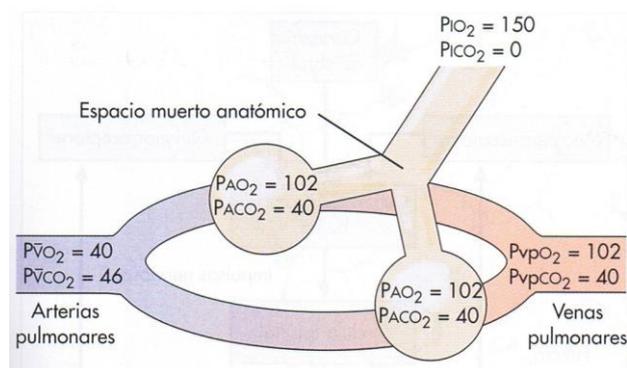


Figura 1. Modelo de un proceso normal de ventilación/perfusión. Adaptado de: M. Berne, 2003.

La eliminación de CO₂ también se produce a favor de gradiente de forma pasiva. Esto es gracias a que la presión de CO₂ en el aire atmosférico es muy próxima a 0 en condiciones normales. Por tanto, el CO₂ de la sangre, que es mayor que en la atmósfera, difunde hacia fuera del cuerpo. A diferencia de lo que pasa en la oxigenación, donde se puede modificar la composición y presión del aire inspirado según necesidades del paciente, con la eliminación de CO₂ se dan más limitaciones ya que no es posible bajar la fracción de CO₂ inspirado y presurizar el aire tampoco tendría repercusión sobre el gradiente. Afortunadamente, el CO₂ es una molécula que difunde mejor que el O₂. Si mantenemos una buena ventilación, el aire del interior del alveolo se irá recambiando y el gradiente se mantendrá. Si la ventilación es escasa, el gradiente será menor y el CO₂ se acumulará. En condiciones normales si se hiperventilan los alveolos el CO₂ en sangre puede bajar. Si estos cambios de concentración de CO₂ son bruscos y son más rápidos que los sistemas de compensación fisiológicos de pH se pueden producir estados de alcalosis o acidosis respiratoria. Los pacientes que además de presentar hipoxemia de origen respiratorio presentan hipercapnia padecen insuficiencia respiratoria global, un estado más grave que la insuficiencia respiratoria parcial, en la que solo está alterada la oxemia.

2. Superficie de intercambio

Está directamente relacionada con la cantidad de alveolos funcionales. Cualquier condición patológica que altere la función alveolar (edema, infección, inflamación) o destruya los alveolos (tromboembolismo pulmonar, enfisema) puede producir insuficiencia respiratoria.

Los alveolos pueden estar colapsados, necrosados, obstruidos o mal perfundidos. En el caso del síndrome respiratorio agudo por SARS-CoV-2 se puede dar todo esto a la vez en mayor o menor grado por todo el parénquima pulmonar.

El colapso alveolar se produce cuando los alveolos no se expanden correctamente. Esto es debido a la disfunción del surfactante pulmonar (una molécula anfifílica también llamada dipalmitoilfosfatidilcolina). El surfactante deja de secretarse, por daño a los neumocitos tipo II y porque el líquido extravasado elimina el surfactante pulmonar de la superficie del epitelio alveolar.

3. Flujo de aire (ventilación)

Es la cantidad de aire que el aparato respiratorio es capaz de movilizar hacia los alveolos. A mayor capacidad de ventilación, mejor función pulmonar. Está relacionado con la permeabilidad de la vía respiratoria, la fuerza muscular, la integridad de la caja torácica, la compresibilidad pulmonar y el control neurológico del centro respiratorio.

Se puede expresar por la cantidad de volumen movilizado en un tiempo determinado. Generalmente en volumen/minuto. El volumen corriente o volumen Tidal es el volumen de aire que se produce en una respiración. Si multiplicamos el volumen corriente por la frecuencia respiratoria (número de respiraciones por minuto) obtendremos el volumen corriente en litros/minuto.

4. Perfusión

Para que se produzca el intercambio de gases entre el aire inspirado y la sangre, la sangre debe circular correctamente por todo el sistema capilar de los alveolos. Para ello es necesario que haya una adecuada hemodinámica general y una correcta integridad de los vasos sanguíneos. En condiciones normales la perfusión de los alveolos es equivalente al gasto cardíaco. El gasto cardíaco es la cantidad de sangre que pasa por el corazón en un minuto.

5. Coeficiente de difusión de los gases

El CO₂ difunde más fácilmente que el O₂. Este es el principal motivo por el que la hipoxia precede a la hipercapnia, que se daría en los casos más graves.

6. Distancia entre las fases

La separación que hay entre la sangre y el aire está relacionada con el grosor del tejido de la pared alveolar y capilar. Cuanto mayor es esta distancia menor es la velocidad de difusión de gases.

En la inflamación de los alveolos secundaria a la infección por SARS-CoV-2 se produce un mayor grosor de la interfase por el aumento de la celularidad y del líquido extravasado.

- Etiopatogenia

El síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) es un cuadro de insuficiencia respiratoria severo de aparición brusca. Las causas pueden ser variadas, pero en todos los casos aparecen lesiones en el alveolo secundarias al proceso inflamatorio.

Las causas de SDRA pueden ser por lesión directa al alveolo o por lesión indirecta. Entre las causas que pueden producir lesión directa se encuentran: neumonía, aspiración de contenido gástrico, inhalación de gases tóxicos, inhalación de fuego o gases calientes, inhalación de oxígeno concentrado, aspiración de agua (ahogados), traumatismo y tromboembolismo pulmonares, entre otras. De las causas que pueden producir lesión indirecta, la sepsis es la causa más común. También puede producirse por sobredosis de algunos fármacos, rechazo de trasplante de pulmón, edema cardiogénico, pancreatitis, transfusión masiva, quemaduras y shock, entre otras.

Inicialmente la lesión que aparece en el endotelio de los capilares conduce a un aumento de la permeabilidad. Se pierden las uniones fuertes intercelulares de las células del endotelio vascular. Las proteínas plasmáticas salen al intersticio. Esto acarrea difusión del agua a la zona. Este fluido intersticial acaba invadiendo el espacio aéreo y hace que se pierda el surfactante, por tanto, los alveolos se colapsan. Se forma una membrana hialina gruesa que sustituye a los neumocitos. El grosor de la interfase aumenta dificultando la difusión de gases.

Todo este proceso se agrava por la activación de los neutrófilos por la acción de citoquinas proinflamatorias como IL1, IL6, IL8 y TNF- α . Los neutrófilos liberan proteasas y radicales libres que dañan aún más los alveolos y los capilares.

El mecanismo exacto por el que el virus SARS-CoV-2 desencadena distrés respiratorio no está del todo determinado. Sin embargo, hay una teoría que relaciona la acción del virus con la ruta de los cininógenos y la bradicinina. La proteína donde se une el virus es la ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) que actúa en esta ruta. El bloqueo de los ACE2 causa un exceso de la actividad de bradicinina. Dicha hiperactividad de bradicinina puede producir tos seca, mialgias, fatiga, náuseas, diarrea, dolor de cabeza o disminución de la función cognitiva. Muchos de estos síntomas se han descrito en los pacientes infectados por el virus SARS-CoV-2. Además, la bradicinina estimula la síntesis de ácido hialurónico e inhibe su degradación. El ácido hialurónico junto al agua del edema intersticial produce un gel en el alveolo que genera un bloqueo adicional al intercambio gaseoso

El edema alveolar produce una disminución de la distensibilidad pulmonar que conduce a su vez a hipertensión de la arteria pulmonar con la consecuente disminución de la perfusión de los alveolos.

La hipoxemia y la hipercapnia producida por la alteración de la difusión de gases puede llegar a producir fallo multiorgánico y la muerte del paciente.

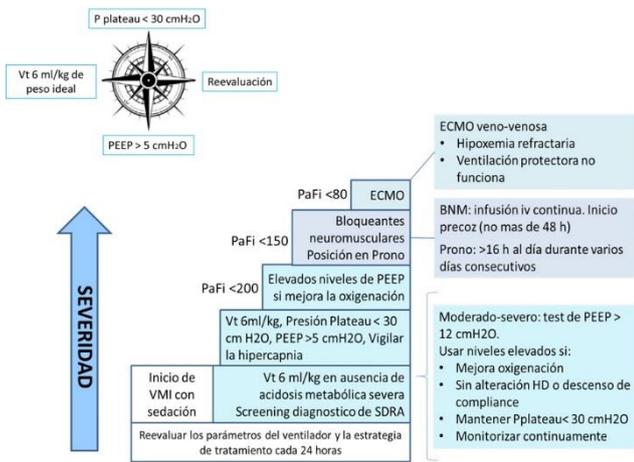


Figura 2. Algoritmo terapéutico en el manejo temprano del SDRA. Adaptado de Papazian *et al*, 2019.

Tratamiento

Etiológico

En el caso del SARS-CoV-2, en las primeras oleadas y en casos graves, se intentó la terapia etiológica con diferentes fármacos en uso que tenían otras indicaciones aprobadas. A muchos pacientes se les trató con hidroxiquina, un antirreumático y antipalúdico, porque algunos estudios limitados recomendaron su uso. Poco tiempo después se publicaron otros estudios con mayor grado de evidencia que desaconsejaban la retirada de la hidroxiquina ya que no demostraron mejor pronóstico y sí un incremento en la aparición de efectos iatrogénicos. Se utilizaron otros fármacos, como por ejemplo antivirales, que resultaron ineficaces, como el lopinavir/ritonavir.

Sintomático y preventivo

Algunos fármacos antiinflamatorios, inmunosupresores o inmunomoduladores demostraron utilidad en disminuir la mortalidad de los pacientes más graves. Inicialmente se utilizaron algunos inmunomoduladores costosos y de uso muy restringido como el tocilizumab. Pero con el tiempo se vio que los fármacos inflamatorios esteroideos clásicos podían frenar la progresión de la insuficiencia si se utilizaban en el momento adecuado.

Se generalizó el uso de las heparinas de bajo peso molecular para prevenir la incidencia de eventos tromboticos con buenos resultados.

Oxigenoterapia

La oxigenoterapia se debe ir adecuando al grado de insuficiencia respiratoria. Los dispositivos no invasivos se pueden aplicar a los pacientes con hipoxias con más de 90% de saturación. El objetivo es conseguir que el paciente se mantenga con una saturación del 94%. Los dispositivos no invasivos son:

- Gafas nasales: aportan un flujo de oxígeno puro de 2 a 6 litros por minuto lo que produce una fracción inspiratoria (FiO₂) variable y aproximada entre 24% y 44%.
- Mascarillas tipo Venturi: se puede alcanzar una FiO₂ estable de hasta el 60%.
- Mascarillas con reservorio: pueden conseguir una FiO₂ variable y aproximada que puede superar el 80%.

La ventilación mecánica no invasiva fue ampliamente utilizada en las primeras oleadas por falta de disponibilidad de respiradores. Esta acción pudo salvar muchas vidas en esos momentos, pero posteriormente se recomendó no retrasar la implantación de la ventilación mecánica invasiva e ingreso en UCI cuando aparecían criterios clínicos. Por tanto, si hay disponibilidad, la ventilación mecánica no invasiva no debe sustituir en ningún caso a la invasiva.

Soporte vital respiratorio en cuidados intensivos

Ventilación mecánica

La ventilación mecánica es un procedimiento terapéutico y de soporte respiratorio para pacientes críticos en el que la ventilación respiratoria está asistida por una máquina (respirador) que ejerce una presión positiva controlada que facilita la entrada del aire necesario a los pulmones. Para ello se necesita disponer de una vía aérea sellada y permeable.

La forma más habitual de conseguir dicha vía aérea es mediante la intubación orotraqueal, que consiste en la introducción de un tubo en la tráquea entrando por la boca del paciente. Las acciones de la ventilación mecánica se basan en tres propiedades fundamentales:

- La posibilidad de proporcionar al paciente oxígeno a mayor concentración y a mayor presión.
- Asistir o suplir al paciente en la ventilación, facilitando el flujo de aire hacia dentro de los pulmones y así conseguir una reducción del trabajo respiratorio del paciente.

- Mantener el volumen pulmonar controlando las presiones de llenado y evitar el colapso pulmonar dejando una presión positiva al final de la espiración (PEEP).

Los objetivos de la ventilación mecánica son: revertir la hipoxemia y la hipercapnia, prevenir o quitar las atelectasias, revertir la fatiga y permitir la sedación profunda y el bloqueo neuromuscular. La sedación y el bloqueo neuromuscular nos ayudan a disminuir el consumo sistémico de oxígeno y la presión intracraneal.

Existen numerosas modalidades de ventilación mecánica que se pueden dividir en dos grandes grupos: ventilación controlada (en la que sólo hay respiraciones mandatorias y el paciente es pasivo) y la ventilación asistida (en la que el paciente inicia la respiración y el respirador le ayuda insuflando aire).

• Intubación orotraqueal

La intubación orotraqueal es una técnica muy peligrosa para el paciente. En los pacientes afectos de distrés respiratorio severo es aún más arriesgado. Se requiere personal experimentado, con dos personas como mínimo.

Se debe preparar todo antes de empezar. Se debe cargar y etiquetar la medicación necesaria, inicialmente se utilizan relajantes musculares como succinilcolina o rocuronio y sedantes como etomidato, midazolam o propofol. Debemos comprobar que tenemos los accesos venosos permeables y de buen calibre para administrar la medicación intravenosa necesaria. Es muy importante comprobar el funcionamiento del laringoscopio, dejar configurados en el respirador los parámetros ventilatorios que se van a aplicar, comprobar el funcionamiento del balón resucitador, comprobar la integridad del tubo orotraqueal con su globo y de las cintas de fijación

Con el laringoscopio se localizará el borde de la epiglotis en la base posterior de la lengua. Se empuja con suavidad hacia arriba, hacia la parte anterior del paciente, que estará colocado en decúbito supino. De esta forma queda a la vista el orificio de entrada a la tráquea. Se introduce el tubo apoyado en el laringoscopio. Se infla el globo que sella la tráquea metiendo el aire con una jeringa y se comprueba la presión de dicho globo con un manómetro. Se auscultan los pulmones comprobando que ambos pulmones están siendo ventilados. Se fija el tubo a la cara del paciente con cintas y se hace una comprobación radiológica de su correcta colocación.

La intubación se realiza con el paciente sedado y miorelajado. Inicialmente el paciente se mantendrá sedado durante las primeras horas desde que empieza con ventilación mecánica hasta nueva valoración.

- Vigilancia y cuidados de enfermería

Los pacientes con ventilación mecánica requieren supervisión directa permanente en unidades de cuidados intensivos. Dentro de los cuidados relacionados con la ventilación mecánica destacan:

- Monitorización de numerosas constantes como: Saturación de oxígeno, frecuencia cardiaca, ondas

electrocardiográficas, tensión arterial, presión venosa central, diuresis horarias, datos analíticos (gasometrías periódicas).

- Sincronía y adaptación del paciente al respirador.
- Control y retirada de secreciones respiratorias.
- Profilaxis de infecciones.
- Valoración de la orientación y la conducta.

- Parámetros del respirador en el manejo del SDRA

Los parámetros del respirador que permiten el manejo del SRDA son:

- Volumen Tidal: inicialmente se pauta un volumen corriente (Volumen Tidal) ajustado al peso ideal del paciente. Por ejemplo 6 mL/kg.
- PEEP: presión mínima al final de la espiración. Es la presión más baja del ciclo respiratorio. Permite mantener los alveolos abiertos y evitar su colapso. Debe ser mayor de 5 cm H₂O. Se puede ir subiendo si el estado de oxigenación no es el adecuado. No se pueden seguir subiendo la PEEP si la subida de la PEEP no mejora la oxigenación (subida de la saturación O₂ o pO₂ arterial), si aparece alteración hemodinámica o ante un descenso de la compresibilidad pulmonar (compliance)
- Presión Plateau (presión meseta): después de la insuflación del volumen prescrito obtendremos una presión máxima relacionada con la resistencia de la vía aérea, llamada presión pico, y al dejar de insufflar obtenemos una presión estable relacionada con la compresibilidad del pulmón que es la presión Plateau. Como objetivo terapéutico esta presión no puede superar los 30 cm H₂O.
- FiO₂: es la riqueza en oxígeno que tiene el aire que se insufla al paciente. Generalmente se inicia a un valor alrededor del 40% y puede ir siendo subida progresivamente si con lo anterior no se consigue una oxemia adecuada.

- Parámetros analíticos para evaluar la oxigenación

Los parámetros analíticos que permiten evaluar el estado de oxigenación son variados. Los principales son los parámetros aportados por las gasometrías arteriales. De todos ellos destaca la pO₂ arterial y en menor medida pCO₂, pH y lactato.

Otros marcadores analíticos muy utilizados en soporte respiratorio son la hemoglobina, la cooximetría, proteína C reactiva, procalcitonina e iones. Casi todos estos parámetros pueden estar disponibles en equipos a cabecera del paciente. Es importante que dichos equipos que están fuera del laboratorio ofrezcan una disponibilidad y una calidad de resultados equiparable a la del laboratorio de urgencias por eso deben estar supervisados por los servicios de laboratorio clínico.

Un parámetro calculado muy utilizado para evaluar la severidad de la insuficiencia respiratoria es la PaFi. La PaFi es el cociente de la pO₂ arterial entre la FiO₂. Ejemplo: Una persona sana tiene una pO₂ de 100 respirando el aire atmosférico, que tiene una FiO₂ de 0,21 (21%). Obtendría una PaFi de 100 / 0.21 =476. A los pacientes con ventilación

mecánica que presenten una PaFi menor de 200 se les debería ir subiendo la PEEP a niveles incluso mayores de 12 si se consigue una mejora de la oxigenación y se tolera hemodinámicamente. Si esto no se produce, se pasa al siguiente escalón; utilización de bloqueantes neuromusculares y colocación al paciente en decúbito prono. Los bloqueantes musculares no se mantendrán más de 48 horas.

- **Ajuste de la pCO₂**

Si la pCO₂ arterial es alta se debe aumentar la ventilación, es decir, aumentar el volumen minuto, que es el mejor indicador de cantidad de aire que moviliza el paciente. El volumen minuto es igual a la frecuencia respiratoria por el volumen Tidal o corriente. Puesto que el volumen Tidal es el adecuado para mantener una determinada presión plateau no lo podemos modificar, por tanto, sólo podemos ajustar la frecuencia respiratoria.

Se aplica una fórmula basada en una regla de tres en la que la frecuencia respiratoria a la que vamos a cambiar multiplicada por la pCO₂ objetivo (que es igual a 48 mmHg) será igual a la frecuencia respiratoria actual multiplicada por el pCO₂ medido.

- **Ajuste de la pO₂**

Para ajustar la pO₂ se dispone de dos parámetros, que son la FiO₂ y la PEEP. El parámetro que mejor refleja la oxigenación de la sangre es el valor de la pO₂ arterial pero también puede resultar válida la saturación que aporta el pulsioxímetro. El objetivo es mantener el valor de la saturación entre 88% y 94%

La FiO₂ suele estar entre 60% y el 80%, y la PEEP es siempre mayor de 5. Se pautará la mínima PEEP que mantiene la oxemia objetivo. La PEEP máxima se obtiene de la clínica del paciente. Si el paciente presenta inestabilidad hemodinámica se habrá llegado al valor máximo de PEEP.

- **Destete o weaning**

Es el proceso en el que el paciente va hacia la retirada de la ventilación mecánica y a ser extubado. Para ello tiene que tener una capacidad respiratoria suficiente, que se evalúa en base a varios parámetros respiratorios, como por ejemplo la PaFi. Debe presentar a su vez: estabilidad hemodinámica, suficiente hemoglobina funcional, no tener fiebre, adecuado nivel de consciencia, vía área permeable, capacidad de toser y estar libre de secreciones. Hay que evitar al máximo la reintubación por su alto riesgo de mortalidad. Se evalúa la capacidad del paciente pasando a modos asistidos o a respiración a tubo en T (sin respirador). Es frecuente tener que retroceder y hacer varios intentos.

- **ECMO (extracorporeal membrane oxygenation)**

Es una técnica que proporciona soporte cardíaco y respiratorio, sacando hacia un circuito extracorpóreo la sangre del paciente hacia un dispositivo que la oxigena y la reinfunde al organismo.

La canulación inicial de un paciente que va a recibir el tratamiento con ECMO es realizada por un cirujano. Un

perfusionista o especialista en el tratamiento ECMO es el encargado del mantenimiento del paciente. Se requiere una atención constante las 24 horas del día durante el tratamiento con ECMO.

El tratamiento ECMO puede asegurar durante días o semanas la oxigenación de la sangre, pero los altos requerimientos técnicos y de personal, junto a su elevado coste y al riesgo de numerosas complicaciones colocan al tratamiento con ECMO en la última opción de tratamiento.

CONCLUSIONES

El distrés respiratorio agudo es un síndrome multicausal con alta mortalidad y que requiere atención urgente y cuidados críticos.

Las medidas terapéuticas se ajustan según la gravedad del paciente. En la valoración de dicha gravedad juegan un papel fundamental ciertos parámetros del laboratorio de urgencias.

El profesional de laboratorio debe conocer bien en que consiste el soporte respiratorio y de esta forma ser consciente de la gran aportación que tiene en el proceso asistencial cuando ofrece un servicio robusto, fiable, siempre disponible y de respuesta rápida.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. Papazian L, Aubron C, Brochard L, Chiche JD, Combes A, Dreyfuss D et al. Formal guidelines: management of acute respiratory distress syndrome. *Ann. Intensive Care*. 2019 Jun 13;9(1):69.
2. Murthy S, Gomersall CD, Fowler RA. Care for Critically Ill Patients With COVID-19. *JAMA* 2020; 323:1499.
3. Chandan JS, Zemedikun DT, Thayakaran R, et al. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Susceptibility to COVID-19. *Arthritis Rheumatol* 2021; 73:731.
4. Mitjà O, Corbacho-Monné M, Ubals M, Tebé C, Peñafiel J, Tobias A, et al. Hydroxychloroquine for Early Treatment of Adults With Mild Coronavirus Disease 2019: A Randomized, Controlled Trial. *Clin Infect Dis*. 2021;73(11):e4073.
5. Garvin M, Alvarez C, Miller I, Prates E, et al. A mechanistic model and therapeutic interventions for COVID-19 involving a RAS-mediated bradykinin storm. *Elife* 2020 Jul 7;9:e59177.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- John E. Hall, Michael E. Hall. Principles of Gas Exchange; Diffusion of Oxygen and Carbon Dioxide Through the Respiratory Membrane PD. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, Fourteenth Edition Chapter 40, 511-520

PERFILES TIROIDEOS DISCORDANTES. “SECRECIÓN INAPROPIADA DE TSH”

Autor: Adrián González Quintana, Silvia Díaz Díaz, Ilenia Liria González

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

Palabras clave: Interferencias, TSH, Hormonas tiroideas.

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones de la función tiroidea constituyen la patología endocrina más frecuente después de la diabetes mellitus. Es por ello que la demanda de pruebas bioquímicas en esta área constituye una carga asistencial muy importante dentro del laboratorio clínico.

Los niveles séricos de la hormona estimulante del tiroides (TSH o tirotrona) y de las hormonas tiroideas (HT) están estrictamente regulados en individuos sanos. Así, la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas, tetrayodotironina (T4) y triyodotironina (T3), está regulada por la TSH. A su vez, la secreción de TSH está regulada por las HT a través de un mecanismo de retroalimentación negativa, como ocurre en otros ejes endocrinos.

Cuando la función hipotálamo-hipofisaria es normal, la concentración de TSH guarda una relación logarítmica/lineal con la concentración de tiroxina libre (T4L); así, pequeños cambios en la concentración de T4L se traducen en una respuesta exponencial, amplificada, en las concentraciones de TSH.

La determinación de TSH es la principal prueba para la evaluación de la función tiroidea y de la integridad del eje hipotálamo hipofisario tiroideo. Las HT se determinarán en caso de valores de TSH fuera de intervalo de referencia. El patrón bioquímico es:

Hipotiroidismo primario: TSH elevada y T4L disminuida.

Hipertiroidismo primario: T4L y/o T3L elevadas con TSH muy baja o suprimida.

Hablamos de “**Secreción Inapropiada de TSH**” (IST, del inglés *Inappropriate Secretion of TSH*) cuando los hallazgos del laboratorio muestran concentraciones elevadas de T4L y T3L en presencia de concentraciones detectables de TSH, al contrario de lo que sucede en las formas más comunes de hipertiroidismo. Puede darse en distintas situaciones fisiopatológicas o ser debido a interferencias metodológicas. Este patrón anormal en las pruebas de función tiroidea es una característica importante de los trastornos genéticos adquiridos del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides como: la resistencia a hormonas tiroideas β (THR β) causada por mutaciones en el gen receptor de hormonas tiroideas β (TR β) o el adenoma hipofisario secretor de TSH (TSHoma)¹. En la Figura 1 se muestra el patrón bioquímico clásico del hipotiroidismo y del hipertiroidismo junto con desviaciones de este perfil y sus posibles causas.

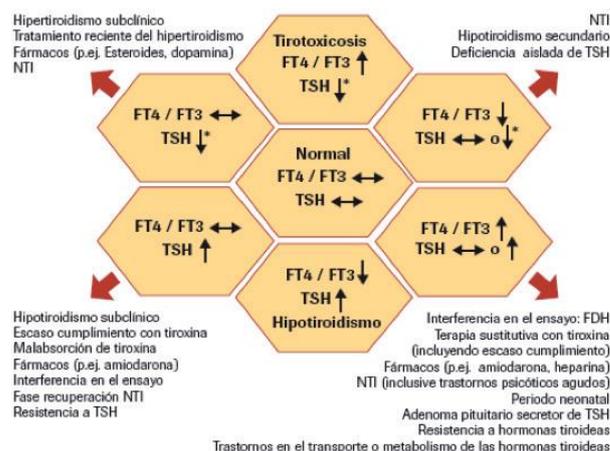


Figura 1. Relación entre TSH y hormonas tiroideas libres en distintas situaciones fisiológicas y patológicas.

NTI: enfermedad no tiroidea, FDH: hipertiroxinemia disalbuminémica familiar

* La TSH puede estar totalmente suprimida, como en el hipertiroidismo primario, o parcialmente suprimida

(por debajo del intervalo de normalidad, pero detectable). Tomada de: Montserrat Mauri Dot, Rocio Alfayate Guerra, 2014. Adaptada de: Gurnell M *et al.* 2011

En la actualidad, esta entidad es un problema en la práctica clínica, originando un retraso en el diagnóstico y/o elección de un tratamiento inadecuado en pacientes con IST (por ejemplo: cirugías hipofisarias en pacientes con THR β o ablación tiroidea en pacientes con TSHoma).

FISIOPATOLOGÍA DE LA IST

La posible causa de IST se puede clasificar en dos grandes grupos:

- **Situaciones fisiopatológicas**

- **Producción Neoplásica de TSH (TSHoma)**

El adenoma hipofisario secretor de TSH es una entidad poco frecuente de hipertiroidismo, se trata de un hipertiroidismo secundario o central, cuyos principales síntomas clínicos son: bocio difuso, defectos visuales, dolores de cabeza, alteraciones menstruales y galactorrea en mujeres. Consiste en una producción autónoma de TSH refractaria a la retroalimentación negativa de las HT, siendo, por lo tanto, esta TSH la responsable de la hiperestimulación de la

glándula tiroides y por consiguiente de la hipersecreción de T4 y T3.

Diagnóstico bioquímico: elevaciones de la T4L y T3L en presencia de TSH detectable. Alrededor del 30% de los pacientes muestran concentraciones de TSH dentro del intervalo de referencia. A pesar de tratarse de un hipertiroidismo TSH-dependiente no hay correlación entre las concentraciones de HT libres y de TSH inmunoreactiva. Se ha postulado que la TSH secretada tiene una actividad biológica aumentada debida a modificaciones posttraduccionales como la glicosilación. También se han reportado casos en la bibliografía de TSHoma ectópicos².

Importante descartar interferencias metodológicas, como anticuerpos heterófilos o anticuerpos anti-T4 y/o anti-T3. Además, de un diagnóstico diferencial con otras causas de TSH elevada de origen no neoplásico como la resistencia a HT.

- Producción No Neoplásica de TSH

1. Resistencia a HT (THR)

La THR es un grupo de trastornos genéticos que condicionan disminución de la sensibilidad tisular a las HT.

La T3L actúa a través de tres tipos de receptores nucleares: TR α 1 (cerebro, huesos, músculos y corazón), TR β 1(hígado) y TR β 2 (hipófisis), lo que explica las diferentes manifestaciones clínicas en los pacientes según el TR alterado.

Los individuos afectados presentan principalmente una mutación en el gen *THR β* . Ocurre en 1:50000 nacidos vivos.

La presentación clínica es variable, es frecuente el bocio seguido de la taquicardia, pero la mayoría están eutiroideos. El patrón bioquímico consiste en T4L y T3L elevadas en presencia de TSH normal o ligeramente elevada y concentración de SHBG (globulina transportadora de esteroides sexuales) normal, considerada como índice de actividad tiroidea a nivel tisular. Existe asociación familiar en el 75 % de los casos, con herencia autosómica dominante.

Los principales hallazgos que ayudan a distinguir entre los adenomas secretores de TSH y THR³ se describen en la siguiente tabla 1.

1	Una mutación en <i>THRβ</i> está en pacientes con THR, pero generalmente no aparece en pacientes con TSHoma.
2	La concentración de la subunidad α sérica es normal en THR, sin embargo, a menudo es alta en pacientes con adenomas secretores de TSH
3	La concentración de SHBG es elevada en pacientes con TSHoma, siendo normales en THR.
4	En el test de estimulación con TRH (Hormona liberadora de tirotrópina): hay una elevación de TSH en pacientes con THR, pero no en la mayoría

	de los pacientes con adenomas secretores de TSH.
5	Los pacientes con THR tienen más probabilidades de tener una caída de los niveles séricos de TSH en respuesta a la administración de T3 (90% vs 12-25%).
6	Los pacientes con THR tienen más probabilidades de tener una disminución en la velocidad de supresión de TSH a las 2 horas tras la inyección subcutánea de un análogo de la somatostatina.

Tabla 1. Diagnóstico diferencial entre adenoma secretor de TSH y Resistencia a HT. Elaboración propia.

2. Pacientes en tratamiento sustitutivo con tiroxina:

- Evaluación temprana del tratamiento del hipotiroidismo.
- Escaso cumplimiento terapéutico.

3. Pacientes hipertiroides sobredosificados en tratamiento sustitutivo con antitiroideos.

4. Alteraciones medicamentosas por el uso de fármacos como:

Algunos pacientes con enfermedad no tiroidea reciben fármacos que con frecuencia pueden tener efecto sobre la función tiroidea, bien sea *in vivo* o *in vitro*, afectando especialmente a pacientes hospitalizados.

- **Amiodarona.** Es un agente antiarrítmico ampliamente utilizado, que se caracteriza por su alto contenido en yodo, y como consecuencia puede causar alteraciones bioquímicas de las pruebas de función tiroidea, con o sin disfunción. En el inicio del tratamiento aparecen TSH y T4L aumentadas, con T3L disminuida. Tras 3 meses de tratamiento, el perfil tiroideo se caracteriza por T4L en el límite alto del intervalo de normalidad, o ligeramente elevada, mientras que la T3L permanece baja o en el límite inferior de la normalidad. La TSH puede seguir aumentado o haberse normalizado.
- **Dopamina o agonistas dopaminérgicos.** Inhiben la secreción de TSH. Podemos encontrar pacientes hipotiroides con TSH normales y pacientes eutiroideos con TSH por debajo del rango de normalidad. Su uso prolongado puede causar hipotiroidismo secundario o central. Por otro lado, los **antagonistas de la dopamina** (sulpirida, haloperidol, clorpromacina) producirán el efecto contrario, aumentado las concentraciones de TSH.
- **Glucocorticoides.** Disminuyen los niveles de TSH y además inhiben la conversión de T4 a T3.
- **Litio.** Se utiliza para el tratamiento de trastornos maniaco-depresivos. El litio tiene múltiples acciones, parecidas al yodo, pero el mecanismo preciso de la disfunción tiroidea inducida por litio es desconocido.

Generalmente aparecen perfiles con TSH disminuida y HT ligeramente elevadas.

- **Anticonvulsiantes.** Principalmente la fenitoína, aumentan el metabolismo de las HT y disminuye la T4L.
- **Interferón α .** Fármaco usado en el tratamiento de la hepatitis C crónica, puede causar disfunción tiroidea, debido a su capacidad de inducir o acelerar la enfermedad tiroidea autoinmune. El mecanismo de acción es desconocido.

- **Interferencias metodológicas**

Debemos sospechar de este tipo de interferencias en nuestra metodología cuando aparezcan:

- Discrepancias del perfil bioquímico y cuadro clínico.
- Discrepancia entre variables fisiológicamente dependientes como son TSH y T4L.
- Resultados inverosímiles.
- Cambios significativos en el patrón bioquímico respecto a resultados previos sin que haya variaciones en el cuadro clínico ni en el tratamiento del paciente.

- **Macro-TSH**

Se trata de un complejo formado por la unión de TSH monomérica a inmunoglobulinas, generalmente IgG. Su presencia puede dar lugar a resultados falsamente elevados, dependiendo de los anticuerpos utilizados en el inmunoanálisis, por ejemplo, los analizadores Cobas® (Roche Diagnostics) son más sensibles a su presencia. Tienen una prevalencia de 0.6-1,6%⁴.

Una forma simple de identificar la interferencia es mediante precipitación con polietilenglicol (PEG) y posterior procesamiento de la prueba en el sobrenadante. Se sospecha la presencia de interferentes de alto peso molecular si se obtienen porcentajes bajos de recuperación. Aunque utilizando el mismo criterio que para la macroprolactina consideraríamos un cut-off del 40 % de recuperación, según la bibliografía, el cut-off para sospechar de presencia de Macro-TSH se encuentra alrededor del 20-25% de recuperación.

La prueba definitiva o *gold standard* es la cromatografía de exclusión.

- **Factor reumatoide**

Pacientes con artritis reumatoide u otras enfermedades autoinmunes pueden presentar concentraciones elevadas. Pueden unirse a los anticuerpos del reactivo, especialmente en métodos inmunométricos como los de TSH dando lugar, a resultados ligeramente elevados. También se han descrito interferencias en T4L.

- **Biotina**

Pequeño cofactor esencial y soluble de la enzima descarboxilasa, sintetizado por bacterias en el intestino, o bien, obtenido directamente de la ingesta de alimentos.

Actualmente, la biotina se utiliza a grandes dosis en enfermos con esclerosis múltiple, enfermedades raras como el déficit de biotinidasa o la acidemia propiónica, además de recetarse como suplemento para alopecia y tratamientos dermatológicos.

Tomado en altas dosis (>5mg/día) puede interferir en los inmunoensayos que utilizan biotina-estreptavidina para amplificar la señal de detección. Aunque muchas de los reactivos están ampliando sus niveles de tolerancia a la biotina, aún pueden surgir casos de interferencias de este tipo.

- **Anticuerpos Anti-estreptavidina**

La prevalencia de interferencia de anticuerpos anti-estreptavidina que afectan las pruebas de función tiroidea no ha sido muy estudiada en la literatura, aunque parece ser menor que la de la biotina, porque el número de interferencias publicadas es muy bajo.

Al igual que la biotina, los anticuerpos anti-estreptavidina provocan interferencias que pueden dar lugar a un mal manejo de la enfermedad. Plataformas que usan complejos de biotina-estreptavidina suelen presentar como interferencia una tendencia a disminución de la TSH, mientras que es más probable que los niveles de T4L y T3L estén elevados. Para detectar estos casos, sería útil procesar la muestra en sistemas que no usen biotina-estreptavidina.

- **Anticuerpos anti T4 y anti T3**

Pueden dar lugar a resultados falsamente elevados de T4L y de T3L según el método utilizado. Los métodos en dos pasos se ven menos afectados. No tienen trascendencia clínica en ausencia de enfermedad tiroidea. El seguimiento de la disfunción tiroidea se hará mediante TSH, siendo el objetivo terapéutico alcanzar concentraciones dentro del intervalo de referencia.

En pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune la prevalencia puede llegar a ser del 30% mientras que en individuos aparentemente sanos es del 1,8 %.

La presencia de anticuerpos antitiroideos se determina incubando el suero del paciente con ¹²⁵I-T4 y con ¹²⁵I-T3 y posterior precipitación con PEG.

- **Anticuerpos heterófilos**

Anticuerpos humanos contra inmunoglobulinas de otras especies animales. Pueden producir interferencias método-específicas, cuando están dirigidos frente al animal del cual procede el anticuerpo. Forman falsos complejos tipo sándwich que darán lugar a resultados falsamente elevados, lo más frecuente, o falsamente disminuidos dependiendo del diseño del ensayo, y de la mayor o menor afinidad del anticuerpo interferente respecto al del reactivo. Ocurre con mayor frecuencia en los métodos no competitivos, como TSH, mientras que los ensayos T4L y T3L son menos propensos a verse afectados por estos anticuerpos interferentes.

Con respecto a los anticuerpos heterófilos contra la TSH, se encontró que su incidencia era del 0,4% en el estudio prospectivo más grande hasta la fecha, que involucró a >5000 pacientes⁴.

Son especialmente importantes los anticuerpos anti-ratón (HAMA), cuya prevalencia en la población general es del 0,2-15 %, según distintos autores, debido al uso creciente de anticuerpos monoclonales de ratón con fines diagnósticos y terapéuticos. La adición de reactivos bloqueantes por parte del fabricante minimiza la interacción.

La prueba inicial recomendada cuando existe la sospecha, en el caso de la TSH:

- Procesar la muestra tras diluciones seriadas. En presencia de una sustancia interferente se pierde la linealidad.
- Otra alternativa es procesar la muestra mediante un inmunoanálisis que utilice anticuerpos de distinto animal.
- Por último, incubación previa de la muestra en tubos conteniendo agentes bloqueantes de los anticuerpos heterofílos, HBT, *Heterophilic Blocking Tube* (Scantibodies)®, que los inactivan, y posterior procesamiento de la misma.

- Anticuerpos Anti-rutenio (Anti-Ru)

Se trata de una interferencia método específica de inmunoensayos de electroquimioluminiscencia (ECLIA) que utilizan estos anticuerpos anti-Ru en sus reactivos, como el analizador Modular de Roche Diagnostics ®. La prevalencia de interferencias por anti-Ru se estima que está entre 0,1-0,24%⁴.

La cantidad de luz emitida durante la electroquimioluminiscencia, es inversamente proporcional a la concentración de T4L o T3L en la muestra en un ensayo competitivo, y directamente proporcional al nivel de TSH en un ensayo sándwich de un paso. Todos los inmunoensayos competitivos, como T4L y T3L, repercute en resultados falsamente elevados, En los no competitivos, como el caso de TSH, se observan resultados falsamente disminuidos o elevados. En los últimos años, el fabricante ha introducido cambios en la configuración del ensayo de T4L y de T3L, con la adición de reactivos bloqueantes, que disminuye la frecuencia de la interferencia.

Ante una sospecha de interferencia por anticuerpos anti-Ru, deberíamos reprocesar la muestra por un método alternativo que no use Ru como marcaje.

- Heparina

Independientemente de su forma de administración, puede causar un aumento en las concentraciones de T4L en suero (hipertiroxinemia artificial) debido a la generación de ácidos grasos libres. El fenómeno se produce *in vitro*, durante el almacenamiento de la muestra o su procesamiento.

En este capítulo hemos querido resumir las principales interferencias identificadas en el perfil tiroideo, pero existen otros tipos de inferencias (Tabla 2) que hacen que en ocasiones nos encontremos ante resultados discordantes sin que sea posible identificar la causa⁴.

Otros tipos de interferencias
Variantes en proteínas transportadoras de HT como TBG, TTR y albúmina. Ej: Variantes la proteína HSA causa de Hipertiroxinemia Disalbuminémica Familiar (FDH)
Variantes en la hormona hipofisaria TSH
Paraproteínas

Tabla 2. Otras causas menos frecuentes de interferencias en el perfil tiroideo. TBG (globina fijadora de tiroxina); TTR (Transterritina o prealbúmina fijadora de tiroxina); HSA (albúmina sérica humana). Elaboración propia.

PAPEL DEL LABORATORIO CLÍNICO ANTE RESULTADOS DISCORDANTES

El laboratorio clínico, y específicamente el laboratorio de hormonas, tiene una labor fundamental a la hora de detectar perfiles inusuales que podrían tratarse de una interferencia. Por ello, en nuestra área de Hormonas y Marcadores Tumorales del Servicio de Análisis Clínicos/Bioquímica Clínica, hemos desarrollado un protocolo con diversos pasos para intentar detectar o evaluar estos posibles resultados anómalos, destacamos:

- Confirmación del resultado repitiendo la prueba con la misma metodología, pero en otro modulo del equipo Cobas ® (Roche Diagnostics); también, se suele confirmar en una nueva extracción de muestra.
- Confirmación del resultado por un método diferente o en un equipo diferente al de nuestro laboratorio.
- Evaluación de los niveles de Factor reumatoide, por los motivos expuestos en este tema.
- Realización de diluciones seriadas de la muestra (1:2, 1:4, 1:8), por ejemplo, en TSH elevadas con HT normales o elevadas. Una pérdida de linealidad puede confirmar la presencia de algún componente interferente; Sin embargo, una buena linealidad de las diluciones no excluye la interferencia. Debemos tener en cuenta que estas diluciones seriadas no son válidas cuando la sospecha de interferencia sean las HT debido a que la dilución altera la unión de las HT y las proteínas de transporte.
- Incubación de la muestra (volumen 500µL) con agentes bloqueantes de anticuerpos heterofílos, para ello utilizaremos los tubos HBT (Scantibodies)®, previamente citados. Tras una hora de incubación, se reprocesará el suero y se compara el resultado. La obtención de un resultado normal no excluye

interferencias, dado que entre un 20%-30% de los casos resultan insensibles a este método.

El uso combinado de la confirmación por otro método, la prueba de diluciones seriadas y los agentes bloqueadores de anticuerpos heterófilos, identificará la interferencia de anticuerpos en aproximadamente el 90 % de las muestras sospechosas⁴.

- Detección de macroinmunocomplejos mediante precipitación $\frac{1}{2}$ con PEG al 25% y posterior determinación por ECLIA del analito (generalmente TSH) en el sobrenadante. Se sospecha la presencia de interferentes de alto peso molecular si se obtienen porcentajes bajos de recuperación. Para la Macroprolactina consideráramos como criterio un *cut-off* del 40 % de recuperación y de la Macro-TSH un *cut-off* del 20-25%. Ante un resultado positivo de Macro-TSH sería necesario confirmarlo con el siguiente punto expuesto.
- Confirmación mediante método de cromatografía de filtración en gel o exclusión (*gold standard*).

Además, es muy importante mantener una estrecha y continua relación con los clínicos, especialmente con el Servicio de Endocrinología, y contactar con ellos para determinar la estrategia a seguir:

- Reevaluación del paciente. Confirmar que tratamiento está siguiendo por si se tratase de interferencia farmacológica (*in vivo* o *in vitro*).
- Efectuar un seguimiento para establecer si la discordancia es transitoria o persistente.
- Evaluar a familiares para evidenciar alteraciones en la unión de las HT a proteínas transportadoras o resistencia hormonal.

CONCLUSIÓN

Las interferencias en las pruebas de función tiroidea siempre deben considerarse cuando surjan discrepancias clínicas o bioquímicas, siendo el patrón de interferencia esencial para guiar su identificación.

Hay varias pruebas disponibles para la detección y la mayoría de ellas son bastante sencillas de realizar e interpretar, como se han expuesto en el apartado anterior. Debe tenerse en cuenta que el informe de estas interferencias es responsabilidad del laboratorio clínico y será fundamental para realizar un manejo y diagnóstico correcto del paciente, evitando tratamientos inapropiados.

CASO CLÍNICO

Niño de 4 meses de vida, del este de Europa, ingresado en la UCI pediátrica por crisis comiciales focales de difícil control a estudio, con debut a los 3 meses y en tratamiento con triple

terapia (Levetiracetam, ácido valproico y Lacosamida) y cofactores (piridoxal fostato, biotina y ácido fólico).

Antecedentes familiares: no enfermedades de interés.

Antecedentes personales: diagnóstico de epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias desde los 3 meses de vida. Desarrollo psicomotor normal. Fenotipo normal. Pendiente de estudio molecular mediante panel de genes de NGS (Next-generation sequencing).

Exploración física: presenta TA: 72/34 mmHg, FC: 128 lpm, FR: 34 rpm. Buen estado general. Bien hidratado, nutrido y perfundido. Buena coloración de piel y mucosas. No exantemas ni petequias. No signos de dificultad respiratoria. No alteraciones cardíacas. Buena ventilación bilateral y simétrica, sin ruidos sobreañadidos. Abdomen: blando, depresible, no doloroso a la palpación. No se palpan masas ni visceromegalias. Neurológico intercrisis: consciente y conectado. Pupilas isocóricas y normorreactivas. Sigue y fija con la mirada. Facies simétrica. Movilidad simétrica de las 4 extremidades. Hipotonía axial. Fontanela anterior normotensa.

Solicitud de analítica de control: Bioquímica, perfil tiroideo, perfil férrico, perfil lipídico, vitaminas y hemograma.

Resultados: mayormente fueron normales, destacando una anemia con Hb de 9,5 g/dL [11,1- 14,1 g/dL] leucopenia con neutropenia. Sin embargo, lo que más nos llama la atención de la analítica es una T4L muy elevada (>7,77 ng/dL [0,92-1,99]) con TSH elevada, un perfil tiroideo discordante que nos hace sospechar de una posible interferencia. Estos fueron los pasos que seguimos:

- Se completa el perfil tiroideo ampliando T3L con resultado normal.
- Se reprocesa la muestra para confirmar T4L.
- Revisamos historia clínica del paciente, así como tratamiento, nos llama la atención que está tomando biotina, molécula que a elevadas dosis puede interferir en los ensayos de perfil tiroideo de los analizadores Cobas ® (Roche Diagnostics), en este caso la T4L.
- Se informa al pediatra de guardia de una posible interferencia en el análisis de T4L.

En estos casos, habría que extraer sangre al paciente al menos 8 horas después de la toma de la biotina (20mg/día).

- Finalmente, gracias a que esa misma semana se estaba evaluando una nueva versión del reactivo de T4L (Elecsys FT4 4, Roche Diagnostics ®) para la determinación de T4L (cuyas mejoras incluyen aumento de la tolerancia a concentraciones de biotina superiores), se decide reprocesar la T4L con este reactivo, obteniendo un resultado normal: T4L= 1,25 ng/dL [0,92-1,99], que cuadra con un perfil de hipotiroidismo subclínico.
- Se informa telefónicamente a su pediatra del perfil tiroideo y de la interferencia por biotina.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. Ohba K. An Update on the Pathophysiology and Diagnosis of Inappropriate Secretion of Thyroid-Stimulating Hormone. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 21;22(12):6611. doi: 10.3390/ijms22126611. PMID: 34205543.
2. Beck-Peccoz P, Lania A, Beckers A, Chatterjee K, Wemeau JL. 2013 European thyroid association guidelines for the diagnosis and treatment of thyrotropin-secreting pituitary tumors. *Eur Thyroid J.* 2013 Jun;2(2):76-82. doi: 10.1159/000351007. Epub 2013 May 7. PMID: 24783044; PMCID: PMC3821512.
3. Campi I, Covelli D, Moran C, Fugazzola L, Cacciatore C, Orlandi F, Gallone G, Chatterjee K, Beck-Peccoz P, Persani L. The Differential Diagnosis of Discrepant Thyroid Function Tests: Insistent Pitfalls and Updated Flow-Chart Based on a Long-Standing Experience. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Jul 7;11:432. doi: 10.3389/fendo.2020.00432. PMID: 32733382; PMCID: PMC7358450.
4. Favresse J, Burlacu MC, Maiter D, Gruson D. Interferences With Thyroid Function Immunoassays: Clinical Implications and Detection Algorithm. *Endocr Rev.* 2018 Oct 1;39(5):830-850. doi: 10.1210/er.2018-00119. PMID: 29982406.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Mahler, GA; Bergoglio, LM. Inappropriate Secretion of TSH Syndrome / Síndrome de secreción Inapropiada de TSH. *Rev. argent. endocrinol. metab;* 50(4): 253-264, dic. 2013.
- Montserrat Mauri Dot, Rocio Alfayate Guerra. Causas de Resultados Discordantes entre TSH Y Hormonas Tiroideas. *Servicio de Análisis Clínicos. Hospital General Universitario de Alicante. Ed Cont Lab Clín;* 17: 23-31.
- Roy E Weiss, Samuel Refetoff. TSH-secreting pituitary adenomas [Internet]. *UpToDate;* Jan 21, 2023 [acceso 17 mayo 2023]. Disponible en: <http://www.uptodate.com>.
- Douglas S Ross. Laboratory assessment of thyroid function. [Internet]. *UpToDate;* Jul 14, 2022 [acceso 17 mayo 2023]. Disponible en: <http://www.uptodate.com>.
- Roy E Weiss, Alexandra M Dumitrescu, Samuel Refetoff. Resistance to thyroid hormone and other defects in thyroid hormone action. *UpToDate;* Jan 21, 2023 [acceso 17 mayo 2023]. Disponible en: <http://www.uptodate.com>.

MONITORIZACIÓN TERAPÉUTICA DE AGENTES ANTIFÚNGICOS

Autor: Julia Sanz Gómez, Sara Peral García, Jon Sánchez Munárriz

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

Palabras clave: Monitorización de fármacos, agentes antifúngicos, azoles

INTRODUCCIÓN

La monitorización terapéutica de agentes antimicóticos se ha consolidado en los últimos años como una herramienta esencial en el manejo de las infecciones fúngicas invasivas. Estas micosis sistémicas, que afectan principalmente a pacientes inmunodeprimidos, se han convertido en un problema médico de especial relevancia como resultado de su creciente incidencia. La evolución de estas infecciones se encuentra condicionada por el estado inmunológico del paciente, las características del patógeno, el momento en que se realiza el diagnóstico en relación al inicio de la infección y la instauración de un tratamiento farmacológico adecuado. Aunque algunos de estos factores se escapan al control inmediato del clínico, la monitorización de la terapia antifúngica es una herramienta accesible que permite garantizar la eficacia y la seguridad del tratamiento.

Sin embargo, no todos los antimicóticos son buenos candidatos a la monitorización terapéutica. Algunos agentes antifúngicos utilizados como fármacos de primera línea para el tratamiento de las micosis sistémicas muestran una fuerte variabilidad en sus concentraciones plasmáticas debido a las inconsistencias que se observan en su absorción, metabolismo, eliminación o a sus interacciones con otras medicaciones. Estas particularidades farmacocinéticas pueden dar lugar a concentraciones sub-terapéuticas o tóxicas del fármaco en el lugar de la infección y contribuir al fracaso terapéutico. Por este motivo, se ha reconocido la necesidad de realizar una monitorización de sus niveles plasmáticos para individualizar la dosificación, especialmente en pacientes complejos con mayor riesgo de desarrollar infecciones fúngicas invasivas. Para definir los fármacos cuya monitorización realmente supone un beneficio se han propuesto tres criterios generales:

- El fármaco debe mostrar una variabilidad farmacocinética significativa, de forma que la relación entre la dosis administrada y sus niveles plasmáticos sea impredecible. Además, no debe ser posible optimizar la dosis en base a la observación clínica ni a pruebas bioquímicas rutinarias.
- Debe existir una clara relación entre la exposición y la eficacia terapéutica o la toxicidad.
- El fármaco debe tener un rango terapéutico estrecho, de forma que variaciones de su concentración plasmática relativamente pequeñas puedan poner en riesgo la eficacia y la seguridad del tratamiento con las dosis utilizadas normalmente en la práctica clínica.

Por otra parte, la aplicación de la monitorización farmacológica requiere de un cuarto criterio esencial, que es la disponibilidad de un método de análisis validado, fiable,

reproducibile, y que permita al clínico obtener los resultados en un tiempo adecuado a las características y necesidades del paciente.

Los únicos agentes antifúngicos que cumplen todos los criterios indicados son la flucitosina y los triazoles itraconazol, voriconazol y posaconazol (Figura 1). De momento, no existen suficientes evidencias que respalden la monitorización sistemática de otros fármacos, como el fluconazol, el isavuconazol, las equinocardinas o los polienos.

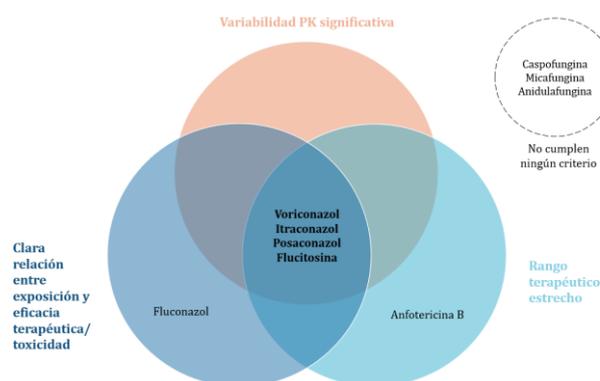


Figura 1. Criterios para la monitorización terapéutica de agentes antifúngicos. Adaptado de Lewis, 2010.

CARACTERÍSTICAS DE AGENTES ANTIFÚNGICOS ESPECÍFICOS

- **Triazoles:** voriconazol, itraconazol y posaconazol

– Características farmacodinámicas

Los azoles constituyen el grupo de agentes antifúngicos más amplio utilizado en la práctica clínica. Desde un punto de vista estructural, están formados por un anillo heterocíclico aromático que contiene dos (imidazoles) o tres (triazoles) átomos de nitrógeno. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición del citocromo p450 14 α -desmetilasa, una enzima con actividad monooxigenasa que cataliza la desmetilación de los precursores lanosterol y/o eburicol en la biosíntesis del ergosterol.

Los triazoles se utilizan en el tratamiento y profilaxis de muchas micosis sistémicas. El voriconazol es un compuesto antifúngico de amplio espectro considerado como agente de primera línea en el tratamiento de la aspergilosis invasiva. Además, también se utiliza en el tratamiento de otras micosis, como la candidiasis invasiva, la fusariosis y la scedosporiosis. El itraconazol es eficaz en la profilaxis y en

el tratamiento de la aspergilosis aguda y crónica y de la aspergilosis broncopulmonar alérgica. También se utiliza en las infecciones localizadas en piel y uñas, en las infecciones por hongos dimetéceos y en las micosis endémicas (coccidioidomicosis, histoplasmosis, blastomycosis y sporotrichosis). El posaconazol se emplea tanto en la profilaxis como en la terapia de rescate de los pacientes con infecciones fúngicas invasivas refractarias a los tratamientos de primera elección, así como en pacientes con zigomicosis.

La relación entre la exposición a los triazoles y su eficacia farmacológica ha sido establecida por muchos estudios farmacodinámicos. Al igual que en el caso de otros agentes antimicrobianos, la actividad de los antimicóticos se cuantifica utilizando los denominados índices de eficacia. Estos índices están condicionados tanto por las concentraciones del fármaco que se alcanzan en el lugar de acción, que son dependientes de su comportamiento farmacocinético, como de la sensibilidad del microorganismo al agente antifúngico, expresada como concentración mínima inhibitoria (MIC). El índice de eficacia ideal para estos tres triazoles es el cociente entre el área bajo la curva concentración plasmática-tiempo medida durante un intervalo de 24 horas y la concentración mínima inhibitoria (AUC/MIC). Sin embargo, dada la dificultad que conlleva la determinación del AUC, la concentración valle en estado estacionario, definida como aquella que se obtiene justo antes de la administración de la siguiente dosis, es el parámetro que más se utiliza en la práctica para la toma de decisiones. Por otra parte, también existe una clara correlación entre las concentraciones plasmáticas de estos fármacos y sus efectos tóxicos, aunque el posaconazol constituye una excepción a esta regla general, ya que no se han encontrado por el momento evidencias que demuestren una relación entre la exposición y su toxicidad.

- Características farmacocinéticas

A excepción del posaconazol, estos fármacos están disponibles tanto en preparaciones orales como intravenosas. El voriconazol se absorbe de forma rápida y casi completa después de su administración oral. Sin embargo, la absorción gastrointestinal del posaconazol y del itraconazol se encuentra limitada por su escasa solubilidad en agua. La biodisponibilidad de ambos fármacos es muy variable, depende de la formulación oral concreta administrada (cápsulas o suspensiones) y se incrementa con la acidez estomacal y cuando se ingieren con comida, especialmente si es rica en grasas. Además, en el caso del posaconazol, la absorción es saturable y dependiente de la dosis, motivo por el cual se recomienda dividir su administración en varias tomas. Los tres compuestos presentan una elevada tasa de unión a las proteínas plasmáticas y altos volúmenes de distribución, lo que les confiere una buena penetración tisular.

Su metabolismo tiene lugar, fundamentalmente, a nivel hepático. Mientras que el posaconazol se metaboliza mediante glucuronización, el voriconazol y el itraconazol son metabolizados a través de mecanismos oxidativos dependientes del citocromo p450. Los metabolitos del voriconazol y del posaconazol no poseen una actividad antifúngica significativa. Sin embargo, el hidroxí-itraconazol,

que es el principal metabolito del itraconazol, tiene una actividad antifúngica comparable a su compuesto parental.

Los triazoles están sujetos a muchas interacciones medicamentosas de relevancia clínica, en especial cuando se administran junto a otros fármacos que se metabolizan a través del citocromo p450. Otra característica fundamental desde un punto de vista de su monitorización terapéutica es que los tres triazoles presentan un perfil farmacocinético no lineal debido a la saturación de su metabolismo hepático a dosis cercanas a las terapéuticas. Esto implica que los cambios en las dosis administradas no se traducen en variaciones proporcionales en sus concentraciones plasmáticas. Por tanto, las modificaciones de la dosis deben realizarse cuidadosamente y de forma progresiva, ya que dan lugar a incrementos desproporcionados de sus niveles séricos. Además, los triazoles muestran una importante variabilidad farmacocinética interindividual. En el caso del voriconazol, se sabe que el origen de esta variabilidad se encuentra asociada en gran parte a los distintos polimorfismos que se observan en el gen que codifica la isoenzima del citocromo p450 CYP19, que es la principal isoenzima encargada de su metabolismo. Estos polimorfismos dan como resultado diferencias significativas en las velocidades de metabolización del fármaco. El origen de la variabilidad farmacocinética del itraconazol y del posaconazol se conoce en menor profundidad, aunque suele asociarse, fundamentalmente, a las inconsistencias que se observan en su absorción.

La velocidad de eliminación de los triazoles es dependiente de la dosis, y es considerablemente mayor en el caso del voriconazol que en el caso del itraconazol y del posaconazol. Por último, su excreción tiene lugar, fundamentalmente, por vía renal y/o biliar, tal y como puede observarse en la Tabla 1.

• Flucitosina

- Características farmacodinámicas

La flucitosina es un derivado fluorado del nucleósido citosina cuyo mecanismo de acción está basado en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos. Este agente antifúngico es convertido en 5-fluorouracilo en el interior de las células fúngicas, donde interfiere en el metabolismo de las pirimidinas y en la síntesis de ARN, ADN y proteínas. Para que las células fúngicas sean sensibles a la flucitosina es necesario que contengan las enzimas citosina permeasa, que permite internalizar la molécula de flucitosina, citosina desaminasa, que cataliza la conversión de la flucitosina en 5-fluorouracilo, y uracilo fosforribosil transferasa, que transforma al 5-fluorouracilo en un sustrato para la síntesis de ácidos nucleicos. Como la mayoría de hongos filamentosos carecen de estas enzimas, el espectro de la flucitosina es reducido y está restringido, fundamentalmente, a hongos levaduriformes, como *Candida* y *Cryptococcus spp.* Actualmente, la monoterapia con flucitosina se encuentra contraindicada debido a la elevada prevalencia de cepas con resistencia primaria y al frecuente desarrollo de resistencias secundarias durante el tratamiento. Por este motivo, solo se recomienda su empleo en terapias combinadas, en las que suele administrarse con anfotericina B.

Diferentes estudios farmacodinámicos han permitido establecer una relación entre la exposición a la flucitosina y su efecto antifúngico. La actividad antimicótica de este fármaco muestra una fuerte dependencia del tiempo, por lo que se requiere una exposición prolongada para asegurar la efectividad del tratamiento. De acuerdo con esta característica farmacodinámica, el índice que mejor predice la efectividad de la terapia con flucitosina es el tiempo de eficacia ($T > MIC$), definido como el tiempo durante el cual las concentraciones plasmáticas del agente antimicrobiano permanecen por encima de la concentración mínima inhibitoria durante el 50% de su intervalo de dosificación. Por otra parte, también se ha demostrado la existencia de una relación entre las concentraciones plasmáticas de flucitosina y sus efectos hepatotóxicos y mielosupresores, así como con la probabilidad del desarrollo de resistencias durante el tratamiento.

- Características farmacocinéticas

La flucitosina se comercializa en Europa en la forma tanto de solución intravenosa como de preparados orales. Debido a su elevada solubilidad en agua y a su bajo peso molecular, su absorción gastrointestinal es rápida y casi completa. Las concentraciones plasmáticas máximas de este agente antifúngico se alcanzan entre 1 y 2 horas después de su administración. Su unión a las proteínas plasmáticas es escasa (3-4%) y se distribuye ampliamente por el organismo, incluyendo el líquido cefalorraquídeo, el humor vítreo y otros líquidos serosos. Su volumen de distribución se aproxima al volumen total de agua corporal. La flucitosina se elimina por vía renal mediante filtración glomerular (90%) y no está sujeta a una reabsorción o secreción significativas. Su metabolización hepática es mínima y su tiempo de vida medio se encuentra en torno a 3 y 6 horas. Su perfil farmacocinético es lineal, por lo que se observa una relación proporcional entre la dosis y sus concentraciones plasmáticas en pacientes con una función renal conservada (Tabla 2). Sin embargo, cuando la flucitosina es administrada junto a otros agentes nefrotóxicos (p. ej., anfotericina, foscarnet, aminoglucósidos, ciclosporina, ...), se pueden observar amplias fluctuaciones en sus concentraciones plasmáticas que hacen necesaria su monitorización.

Fórmulas disponibles	Solución iv Preparados orales
Dosis estándar recomendada	100-150 mg/Kg al día dividido en cuatro dosis
Biodisponibilidad oral	76-89%
C_{max}	50-100 µg/mL
Unión a proteínas plasmáticas	3-4%
Volumen de distribución	0.4-0.8 L/Kg
t_{1/2}	3-6h
Eliminación	Filtración glomerular
Perfil PK	Lineal

Tabla 2. Características farmacocinéticas de la flucitosina.

Elaboración propia

MONITORIZACIÓN

La monitorización de las concentraciones plasmáticas de agentes antifúngicos ha demostrado dar lugar a una mejora

de la respuesta al tratamiento, a la prevención de reacciones adversas, al mejor manejo de las interacciones medicamentosas y, en consecuencia, a un ahorro derivado de tratamientos inadecuados.

Esta monitorización debe realizarse en estado estacionario, una vez se ha alcanzado el equilibrio entre las concentraciones plasmáticas y tisulares. Se recomienda realizarla a intervalos regulares, con una frecuencia adecuada a las características clínicas del paciente y, también, en circunstancias determinadas, entre las que se incluyen: modificaciones en la dosis, cambios en la vía de administración, terapia con otros fármacos que puedan interferir en el tratamiento, cambios en las condiciones clínicas del paciente, toxicidad, falta de respuesta a la terapia o falta de adherencia al tratamiento.

A pesar de que el área bajo la curva concentración plasmática-tiempo (AUC) es el parámetro que mejor refleja la exposición farmacológica, su uso es infrecuente en la práctica, ya que su determinación requiere la extracción de múltiples muestras de sangre durante cada intervalo de administración. Por este motivo, el parámetro más utilizado a nivel clínico para optimizar la relación eficacia/toxicidad es la concentración medida justo antes de la administración de la siguiente dosis o concentración plasmática en valle, la cual muestra una buena correlación con el área bajo la curva. A continuación, se detallan algunas recomendaciones específicas para la monitorización de los cuatro agentes antifúngicos:

- **Voriconazol.** El estado estacionario se alcanza a los 5-7 días desde el inicio del tratamiento, aunque este tiempo puede reducirse a 3-4 días si se administra una dosis de carga. Las recomendaciones actuales establecen como intervalo terapéutico óptimo niveles valle entre 1.0 y 5.5 mg/L. Las concentraciones superiores a 4 mg/L se han relacionado con la aparición de neurotoxicidad, y las superiores a 5 mg/L con la presencia de efectos hepatotóxicos. El límite de eficacia terapéutica varía entre 0.5 mg/L y 1.0-2.2 mg/L en función de los estudios.
- **Posaconazol.** El estado estacionario tarda en alcanzarse entre 7 y 10 días. Como concentraciones mínimas orientativas para garantizar su eficacia se han establecido niveles valle de 0.5-0.7 mg/L tanto para profilaxis como para el tratamiento. De momento, no se ha encontrado una clara correlación entre la exposición al posaconazol y su toxicidad.
- **Itraconazol.** Se recomienda comenzar la monitorización 4-7 días después del inicio de la terapia. En el caso de las formulaciones orales, puede ser de utilidad monitorizar las concentraciones plasmáticas 2-4 horas después de su administración para evaluar la absorción gastrointestinal. Como concentraciones mínimas de eficacia se han establecido niveles valle de 0.5 mg/L para profilaxis y 1.0-2.0 mg/L para el tratamiento. Por el momento, no hay datos que definan una concentración valle orientativa para toxicidad.

- **Flucitosina.** La monitorización debe comenzar transcurridos 3 días desde el inicio del tratamiento. Se recomienda que las concentraciones en valle se encuentren por encima de 25 mg/L para evitar la aparición de resistencias, mientras que los niveles en pico deben mantenerse entre 50-100 mg/L para minimizar el riesgo de toxicidad. Para los pacientes que están en tratamiento con una infusión continua de flucitosina la concentración sérica recomendada es de 50 mg/L.

MÉTODOS ANALÍTICOS

Se han desarrollado diversos métodos para la monitorización de agentes antifúngicos en muestras biológicas de suero o plasma. La mayoría de estos métodos pueden encuadrarse en dos clases generales: bien en métodos cromatográficos, bien en métodos microbiológicos. Cada uno de ellos presenta ventajas e inconvenientes que se expondrán a continuación:

- **Bioensayos o métodos microbiológicos.** Son métodos sencillos y asequibles, que pueden ser de utilidad para laboratorios pequeños y con menores recursos económicos. Sin embargo, presentan importantes desventajas, como son su menor sensibilidad, precisión y exactitud. Además, requieren un mayor tiempo de análisis (el tiempo mínimo de lectura e incubación es de 24 horas) y es necesario hacer una validación cruzada con métodos cromatográficos para asegurar su validez. En la Figura 2 puede observarse el desarrollo de un bioensayo para la determinación de voriconazol en muestras de suero. En este método de difusión en disco se han introducido en los pocillos de una placa de agar inoculada con una cantidad estandarizada de levaduras determinados volúmenes de calibradores, controles y muestras. Una vez incubada la placa, se mide el diámetro de los halos de inhibición de desarrollo, que es lo que se relaciona con la concentración de agentes antifúngicos. Por tanto, estos métodos no detectan la concentración de antimicóticos, sino que se basan en la medida de su actividad biológica y, como consecuencia, están sujetos a dos limitaciones que están ausentes en los métodos cromatográficos:
 - No son aplicables a los pacientes que están en tratamiento con una combinación de agentes antifúngicos, ya que los resultados reflejan la actividad conjunta de todos los fármacos administrados.
 - En los pacientes que se encuentran en tratamiento con itraconazol, los resultados se encuentran interferidos por el metabolito hidroxí-itraconazol, que tiene una actividad antifúngica comparable al compuesto parental.

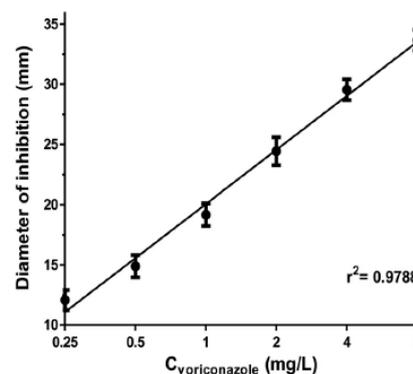
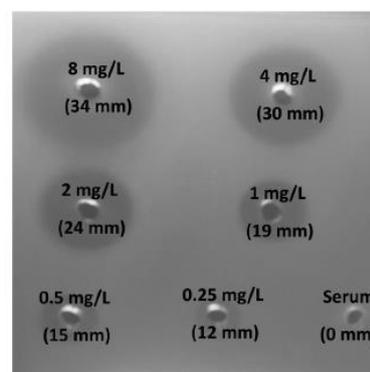


Figura 2. Desarrollo de un bioensayo para la determinación de voriconazol. Tomado de Siopi M et al, 2016

- **Métodos cromatográficos.** Dentro de este grupo se encuentran todos los métodos de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a diferentes técnicas de detección, como son la absorción en el ultravioleta visible, la fluorescencia o la espectrofotometría de masas. Debido a sus evidentes ventajas en comparación con los bioensayos, son los métodos que han encontrado una mayor aplicación. Destacan por ser más fiables y reproducibles, tener una mayor sensibilidad y especificidad, requerir un menor tiempo de análisis, así como por ofrecer la posibilidad de determinar simultáneamente varios compuestos en cada muestra. Sin embargo, requieren una instrumentación de mayor coste que puede no ser asequible para todos los laboratorios, especialmente en el caso de LC-MS/MS. Además, su validación e implementación implican una mayor complejidad técnica y requieren de personal con un mayor grado de cualificación. Estas circunstancias han contribuido a limitar la disponibilidad de este tipo de análisis a laboratorios de referencia. La externalización de las pruebas conlleva una dilatación del tiempo que transcurre desde que se solicita el análisis hasta que se obtiene el informe de resultados, y este incremento del tiempo de respuesta hace que se pierda, en muchos casos, la utilidad clínica de la monitorización de antimicóticos. Sin embargo, en los últimos años, han aparecido en el mercado varios métodos comerciales que podrían facilitar la incorporación de estos servicios

de monitorización al suprimir la necesidad de desarrollar métodos propios. Entre ellos pueden destacarse los métodos cromatográficos ofrecidos por Recipe¹² y Chromsystems¹³, así como el kit de inmunoensayo de ARK Diagnostics¹⁴ para la determinación cuantitativa de voriconazol.

CONCLUSIONES

Las particularidades farmacocinéticas del voriconazol, del posaconazol, del itraconazol y de la flucitosina hacen que la monitorización sistemática de sus niveles séricos sea una práctica complementaria y fundamental en el tratamiento y evolución de los pacientes con infecciones fúngicas invasivas. La dosificación individualizada de estos agentes mediante la determinación de sus concentraciones plasmáticas ayuda a evitar la aparición de toxicidad, a manejar las interacciones medicamentosas y a prevenir el fracaso terapéutico y la aparición de resistencias asociados a la sub-exposición farmacológica. Sin embargo, en muchos casos, serían necesarios estudios adicionales que ayudasen a estandarizar las directrices y proporcionasen datos definitivos relativos al inicio y a la frecuencia con que debe realizarse la monitorización y a las concentraciones diana que deben alcanzarse en los distintos escenarios clínicos. Además, la disponibilidad de un método de análisis económico y accesible también ha demostrado ser esencial, ya que el tiempo de respuesta puede limitar la utilidad de la monitorización terapéutica en los pacientes críticos. De acuerdo con los datos disponibles actualmente, la monitorización rutinaria de otros agentes antimicóticos, como son los polienos, las equinocardinas, el fluconazol o el isavuconazol, no se encuentra recomendada.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. Therapeutic drug monitoring. HPLC Column Itraconazole, Posaconazole and Voriconazole in Serum/Plasma [Internet]. Chromsystems [citado 10 feb 2023]. Disponible en: <https://chromsystems.com/en/products/therapeutic-drug-monitoring.html>.
2. Chemicals + Instruments GmbH | Solutions for Clinical Diagnostics [Internet]. RECIPE [citado 10 feb 2023]. Disponible en: <https://recipe.de/>
3. ARK™ Voriconazole II Assay (Vfend®) [Internet]. ARK Diagnostics [citado 10 feb 2023]. Disponible en: <https://www.ark-tdm.com/products/antifungal/voriconazole/index.html>

BIBLIOGRAFIA GENERAL

- Ashbee HR, Barnes RA, Johnson EM, Richardson MD, Gorton R, Hope WW. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(5): 1162-1176.
- Bellmann R, Smuszkiewicz P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. *Infection* 2017; 45(6): 737-779.
- Cendejas-Bueno E, Cuenca-Estrella M, Gómez-López A. Indicaciones clínicas de la monitorización de azoles de uso sistémico. Hacia la optimización del tratamiento de la infección fúngica. *Rev Esp Quimioter* 2014; 27(1): 1-16
- Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quimioter* 2010; 23(4): 169-176.
- Jager NG, van Hest RM, Lipman J, Taccone FS, Roberts JA. Therapeutic drug monitoring of anti-infective agents in critically ill patients. *Expert review of clinical pharmacology*, 2016; 9(7): 961-979
- Kably B, Launay M, Derobertmeasure A, Lefeuvre, S, Dannaoui E, Billaud EM. Antifungal drugs TDM: trends and update. *Ther Drug Monit* 2022; 44(1): 166-197.
- Lewis RE. Antifungal Therapeutic Drug Monitoring. *Curr Fungal Infect Rep* 2010; 4(3):158-167.
- Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003; 11(6): 272-279.
- Siopi M, et al. Bioassay for determining voriconazole serum levels in patients receiving combination therapy with echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60(1): 632-636.
- Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(2); 171-179.

	Voriconazol	Posaconazol	Itraconazol
Fórmulas disponibles	Cápsulas Suspensión oral Preparación iv	Cápsulas Suspensión oral	Cápsulas Suspensión oral Preparación iv
Biodisponibilidad	Elevada (>96%)	Muy variable Escasa e impredecible con el uso de suspensiones. Aumenta con la administración de cápsulas.	Muy variable (~50-80%) Es cerca de un 30% superior con el uso de suspensiones orales que con cápsulas.
Recomendaciones administración oral	Recomendable administrar en ayunas	Recomendable administrar tras las comidas. Su biodisponibilidad aumenta con la acidez del estómago y con la presencia de grasas. Su absorción oral es saturable y disminuye con la dosis.	<i>Cápsulas:</i> recomendable administrar tras las comidas. Su biodisponibilidad aumenta con el pH del estómago y con la presencia de grasas. <i>Suspensiones orales:</i> recomendable administrar en ayunas.
Dosis estándar recomendada	IV: Dosis de carga de 6 mg/Kg cada 12h el primer día. Después, 4 mg/Kg cada 12h. Oral: 200mg cada 12h	600-800 mg/día dividido en varias dosis	IV: Dosis de carga de 400mg durante dos días. Después, 200mg al día Oral: 200 mg cada 12h
Unión a proteínas plasmáticas	42-58%	98-99%	96-98%
Volumen de distribución	4.6L/Kg	5-25L/Kg	11L/Kg
Metabolismo principal	Hepático: principalmente por CYP2C19 y, en menor medida, por CYP3A4 y CYP2C9	Hepático: glucuronización (uridinadifosfato glucuronosiltransferasa 1A4)	Hepático: CYP3A4
Metabolitos activos	NO	NO	SÍ (hidroxi-itraconazol)
Perfil PK	No lineal	No lineal	No lineal
Origen principal de la variabilidad PK interindividual	Metabolismo: polimorfismos del gen que codifica CYP2C19	Absorción impredecible	Absorción impredecible
T_{1/2}	6-12h	25-34h	34-42h
Vía de eliminación principal	80% de los metabolitos excretados en la orina	77% en heces	54% en heces y 35% en orina

Tabla 1. Características farmacocinéticas del voriconazol, itraconazol y posaconazol. Elaboración propia

PRUEBAS FUNCIONALES EN LA PATOLOGÍA HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIA: ENFERMEDAD DE CUSHING Y ACROMEGALIA

Autor: Ilenia Liria González, Silvia Díaz Díaz, Adrián González Quintana

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

Palabras clave: Cushing, Acromegalia, Funcionales

INTRODUCCIÓN

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 abarca 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 (PRL), tirotropina (TRH), hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH).
- Neurohipófisis o hipófisis posterior formada por las terminaciones nerviosas procedentes de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo y que producen vasopresina y oxitocina.

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.

La desregulación en la tasa de crecimiento de las células que conforman la adenohipófisis da lugar a los adenomas hipofisarios. Las manifestaciones clínicas de un adenoma son diversas y están relacionadas con: 1) un cambio en la secreción de las hormonas producidas por la adenohipófisis y con ello una desregulación de distintas funciones vitales y 2) con el tamaño del tumor debido a que el crecimiento de la masa tumoral puede llegar a presionar el quiasma óptico².

Los adenomas hipofisarios se encuentran entre los tumores intracraneales más frecuentes. Aunque la mayoría son benignos y rara vez tienden a malignizar, suelen comportarse de manera agresiva debido a la compresión de la masa o las alteraciones hormonales.

RITMOS BIOLÓGICOS

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 de sueño y vigilia. Este ritmo circadiano está determinado por el núcleo supraquiasmático que impulsa la liberación de la concentración de CRH que conduce a la producción de ACTH y cortisol³.

Las concentraciones plasmáticas de corticotropina (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.

Otras hormonas, como la GH o la prolactina, presentan una secreción pulsátil. Durante el día mantienen una concentración estable y relativamente baja con varios picos secretores aproximadamente 3 horas desde las comidas o la realización de ejercicio. Durante la noche, se produce un aumento de la actividad secretora que comienza 90 minutos antes del sueño y alcanza el pico durante el sueño profundo.

Debido a estas características de la secreción hormonal, es necesario, en algunas ocasiones, realizar más de una extracción para evitar errores en su interpretación. Para ello, se emplean las pruebas funcionales son de gran ayuda en el diagnóstico de las enfermedades endocrinas.

PRUEBAS FUNCIONALES

• Enfermedad de Cushing

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.

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. En este capítulo, nos centraremos

únicamente en las pruebas funcionales empleadas para el diagnóstico de la enfermedad de cushing.

– Test de supresión con dexametasona (DXM) nocturna

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. Las pruebas de supresión con DXM varían en función de su utilización como prueba de cribado inicial (supresión con 1 mg), o su uso para establecer el diagnóstico diferencial con adenomas hipofisarios o ectópicos (supresión con 8 mg) o para el diagnóstico diferencial con pseudocushing (supresión con dexametasona combinada con CRH).

1. Supresión nocturna con DXM 1 mg (Test de Nugent): Es uno de los más empleados en la práctica. Consiste en administrar 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. Valores de cortisol post-dexametasona $<1.8 \mu\text{g/dL}$ (Sensibilidad 95% y Especificidad 80%) descartan el síndrome de cushing.
2. Supresión con dosis altas de DXM 8 mg: Esta prueba se fundamenta en la frenación parcial de la secreción de ACTH en los adenomas hipofisarios que no ocurre en los tumores ectópicos. Esta supresión puede realizarse de dos formas:
 - Nocturna: 8 mg de DXM y extracción a las 8 – 9h del día siguiente.
 - 48 horas: 2 mg de DXM cada 6 horas y extracción a las 8-9h del día 3.

En ambos casos, se considera que una disminución del cortisol post-DXM superior al 50% del valor basal sugiere que existe una producción de ACTH hipofisaria (Sensibilidad 79% y Especificidad 67%). Esta prueba presenta algunas limitaciones debido a que algunos adenomas hipofisarios grandes son resistentes a la supresión con dosis altas de dexametasona.

3. Prueba de DXM-CRH: Esta prueba nos permite diferenciar los pacientes con hipercortisolismo sin verdadero cushing (pseudocushing) de los pacientes con enfermedad de 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. Por tanto, será necesario realizar una extracción basal y a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos de la estimulación con CRH para determinar cortisol y ACTH. Una ACTH estimulada $>16 \text{ pg/mL}$ (Sensibilidad 95% y Especificidad 86%), y un cortisol post-CRH $>1,4 \mu\text{g/dL}$ (Sensibilidad 96,5% y Especificidad 85%), permite diagnosticar enfermedad de cushing. En pacientes con pseudocushing el cortisol no aumentará.

Tiempo de extracción	ACTH (pg/mL)	Cortisol ($\mu\text{g/dL}$)
Basal	3	4.60
15 min	17	12.30
30 min	17	16.20
60 min	8	10.90
90 min	6	8.67
120 min	4	6.63

Interpretación: Una concentración de ACTH estimulada $>16 \text{ pg/mL}$ (sensibilidad 95%, especificidad 86%) y un cortisol post-CRH $>1,4 \mu\text{g/dL}$ (Sensibilidad 96,5%, Especificidad 85%) se considera respuesta positiva que no se observa en otras situaciones consideradas como pseudocushing.

Tabla 1. Ejemplo de test de supresión con dexametasona combinada con CRH. Elaboración propia.

– Test de CRH

El test de CRH nos va a permitir establecer la etiología final del síndrome de cushing siendo útil para diferenciar el origen hipofisario del 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 y/o de cortisol superior al 20% indican un origen hipofisario (Sensibilidad 91-100% y Especificidad 88-93%)⁴. Sin embargo, si no se produce respuesta indica una secreción ectópica de ACTH o un síndrome de cushing ACTH-independiente. Como limitaciones encontramos que un 10-15% de pacientes con enfermedad de cushing pueden tener una respuesta baja o nula y un 10% con secreción ectópica puede presentar respuesta a CRH.

Tiempo de extracción	ACTH (pg/mL)	Cortisol (µg/dL)
Basal	33	35.20
15 min	46	42.00
30 min	28	37.60
60 min	28	32.00
90 min	31	28.00

Interpretación: Se obtiene un incremento máximo del 40.86 % para ACTH y del 6.82 % para cortisol que indican una respuesta insuficiente y por tanto una secreción ectópica de ACTH o un origen suprarrenal.

Tabla 2. Ejemplo de test de CRH sin respuesta. En este test no se extrajo el punto de 120 minutos por malestar del paciente. Elaboración propia.

Tiempo de extracción	ACTH (pg/mL)	Cortisol (µg/dL)
Basal	4	9.38
15 min	17	17.50
30 min	14	20.40
60 min	8	16.90
90 min	8	15.20
120 min	3	12.10

Interpretación: 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%.

Tabla 3. Ejemplo de test de CRH que orienta a origen hipofisario. Elaboración propia.

– Cateterismo bilateral de senos petrosos

Diferenciar entre enfermedad de Cushing y síndrome de Cushing ectópico puede ser complejo, especialmente cuando los resultados analíticos o las pruebas funcionales son discordantes o no se evidencian lesiones en la resonancia magnética nuclear (RMN) del área hipofisaria. Para el diagnóstico diferencial entre ambas situaciones el *gold standard* es el cateterismo de los senos petrosos que nos va a permitir a su vez determinar la lateralización en caso de enfermedad de Cushing.

La determinación de ACTH en muestras obtenidas simultáneamente en los senos petrosos inferiores y en una vena periférica permite calcular un gradiente de concentración central-periférico que indicará si la producción

de ACTH tiene un origen ectópico o hipofisario y en este caso permite determinar la lateralización del mismo.

La administración de CRH y la extracción de sangre a las 2, 5 y 10 minutos incrementa la eficiencia diagnóstica de la prueba.

Un gradiente ACTH central-periférico ≥ 2 en muestras basales o ≥ 3 tras estímulo con CRH indica enfermedad de Cushing hipofisaria⁴ (Sensibilidad 95-99% y Especificidad 91-99%). Un gradiente interpetroso ≥ 1.4 sugiere una localización del adenoma en el lado del seno petroso con mayor concentración de ACTH⁴.

En el muestreo bilateral de los senos petrosos hay una tasa de falsos negativos del 1 al 10% que pueden deberse a anomalías en el drenaje venoso, a la presencia de senos petrosos hipoplásicos o a dificultades para lograr la cateterización, a la falta de experiencia o por problemas técnicos durante la realización del cateterismo. La corrección de los resultados obtenidos de ACTH con otra hormona segregada por la hipófisis anterior, aumenta la fiabilidad del diagnóstico. Por ello, se ha acudido a la medición de prolactina como una forma de precisar el drenaje venoso hipofisario y de esta manera disminuir el riesgo de obtener un resultado falsamente negativo.

• Acromegalia

El eje hipotálamo-hipófisis-somatotropo regula los procesos de crecimiento. Su alteración da lugar a distintas patologías que se clasifican en función de si se produce un exceso o un déficit en la concentración de la hormona del crecimiento (GH) o en su función.

El diagnóstico de los trastornos del crecimiento se basa en la clínica, estudios hormonales, radiológicos y genéticos. Como hemos comentado anteriormente debido a que la secreción de GH es pulsátil y con una vida media corta, su determinación basal es de poca utilidad para diferenciar individuos sanos y pacientes con acromegalia⁵.

La acromegalia se origina por una producción excesiva de GH causada por un tumor hipofisario en la mayoría de los casos (aproximadamente un 95%). Algunos de estos tumores (25% de los casos) también secretan prolactina. El resto de los casos de acromegalia se debe a un tumor ectópico productor de GH o de hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH).

El diagnóstico bioquímico de la acromegalia se realiza a través de pruebas funcionales que demuestran una secreción aumentada y autónoma de la hormona de crecimiento (GH). La determinación del factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I) se considera el principal marcador de la actividad de la acromegalia, siendo su determinación aislada de mayor utilidad en el diagnóstico que la determinación aislada de GH⁵. Un valor de IGF-I elevado, respecto al intervalo de referencia por edad y sexo, y la falta de supresión de GH tras SOG confirman el diagnóstico.

– Sobrecarga oral de glucosa

La prueba funcional de elección para el diagnóstico de la acromegalia es la sobrecarga oral de glucosa (SOG) con 75g. La administración de glucosa induce un aumento del

tono de la somatostatina que suprime la secreción de GH en condiciones normales. Esta respuesta no se produce en situaciones de hipersecreción autónoma de GH como ocurre en el caso de la acromegalia. Los valores séricos de GH tras SOG alcanzan valores inferiores a 1 ng/ml en individuos sanos, siendo con frecuencia valores indetectables. En pacientes con acromegalia ocurre una ausencia de supresión y a menudo se produce una respuesta paradójica en la que se pueden observar aumentos de GH⁵.

Actualmente, el criterio para considerar que existe supresión es una concentración GH tras SOG menor o igual a 0.4 ng/mL, o menor de 0.3 ng/mL, según otros autores. No obstante, la última guía de práctica clínica de la *Endocrine Society* sugiere que un valor discriminante de GH inferior a 1 ng/mL después de la SOG es suficiente para excluir el diagnóstico.

Tiempo de extracción	GH (ng/mL)	Glucosa (mg/dL)
Basal	3.28	75
30 min	2.91	120
60 min	0.41	132
90 min	0.16	145
120 min	0.08	131

Interpretación: Test de SOG con adecuada frenación de GH tras estímulo (GH <0.4 ng/mL).

Tabla 4. Ejemplo de test de SOG con adecuada frenación. Elaboración propia.

Tiempo de extracción	GH (ng/mL)	Glucosa (mg/dL)
Basal	1.22	90
30 min	1.11	169
60 min	1.77	178
90 min	1.60	156
120 min	1.28	109

Interpretación: Test de SOG que no suprime adecuadamente la secreción de GH tras estímulo (supresión adecuada si GH <0.4 ng/mL).

Tabla 5. Ejemplo de test de SOG sin frenación. Elaboración propia.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. Araújo Castro E, Pascual Corrales E, Ortiz Flores AE, Escobar Morrale HF. Eje hipotálamo-hipofisario. Fisiología y patología. *Medicine*. 2020;13(15):846-55. <https://doi.org/10.1016/j.med.2020.09.003>.
2. Rostad, S. Pituitary adenoma pathogenesis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012;19(4):323-327. <https://doi.org/10.197/MED.0b013e328354b2e2>.
3. Debono M, Ghobadi C, Rostami-Hodjefan 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. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2380>.
4. González Fernández L, Añez Ramos RJ, et al. Cateterismo de senos petrosos inferiores y estimulación con CRH: 15 años de experiencia en un hospital de tercer nivel. *Endocrinol.Diabetes Nutr*. 2021;98(6):381-388. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2020.10.013>.
5. Villabona C, Soler J. Diagnóstico bioquímico y morfológico: criterios y algoritmo diagnóstico. *Endocrinol. Nutr*. 2005; 52(3):23-27.
6. Audi Parera L, Granada Ybern L, Berlanga Escalera E. Diagnóstico y seguimiento de la Acromegalia. En: Comité de Comunicación de la Sociedad Española de Medicina de Laboratorio. Estudio del eje somatotropo. Barcelona, 2017: 114-133.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Cordero F, García JA, Marazuela M, et al. Guía práctica de diagnóstico y tratamiento de la acromegalia. *Endocrinol Nutr*. 2013;60(8):457.e1-457.e15.
- González A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 2ª ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
- Guyton AC, Hall J. Compendio de Fisiología Médica. 12ª ed. Barcelona: Elsevier; 2011.
- Santos S, Santos E, Gaztambide S, Salvador J. Diagnóstico y diagnóstico diferencial del síndrome de Cushing. *Endocrinol Nutr*. 2009;56(2):71-84.

HE4: MARCADOR TUMORAL EN EL CÁNCER DE OVARIO

Autor: Sara Peral García, Adrián González Quintana, Silvia Díaz Díaz

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

Palabras clave: Cáncer de ovario, HE4, Marcadores tumorales

CÁNCER DE OVARIO

El cáncer de ovario es el tipo de tumor más letal entre los cánceres ginecológicos, siendo la quinta causa de muerte por cáncer en las mujeres. Otros cánceres ginecológicos más prevalentes, como los de útero y cérvix, tienen una mortalidad menor ya que se detectan más fácilmente. La letalidad elevada del cáncer de ovario se puede deber a los síntomas poco específicos, así como a la falta de estrategias eficaces en la detección y diagnóstico precoz, por lo que más del 60% de las pacientes son diagnosticadas en un estadio avanzado (estadio III o IV), siendo la tasa de supervivencia a los 5 años de solo 20%-25%. Sin embargo, la tasa de supervivencia a los 5 años para el cáncer de ovario en estadios tempranos va del 70-90%. Por tanto, dado que la supervivencia va unida al estadio, el diagnóstico precoz de los tumores malignos de ovario es un factor clave para mejorar la tasa de supervivencia de estas pacientes.

La prevalencia de cáncer de ovario es baja en mujeres jóvenes (menores de 40 años) pero aumenta con la edad. La mayor parte de casos acontece después de la menopausia siendo la edad media del diagnóstico en España los 63 años.

Los ovarios son unas glándulas esenciales para la reproducción sexual y la malignidad aparece cuando las células del ovario empiezan a multiplicarse de manera descontrolada. Se describen tres tipos de tumores:

- Tumores epiteliales o cáncer de ovario epitelial (COE); se corresponden con el 80-90% de todos los tumores de ovario. Su desarrollo tiene lugar en las células epiteliales que recubren la parte más externa de los ovarios. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se pueden clasificar en 6 tipos histológicos: serosos, mucinosos, endometrioides, células claras, transicionales y de células escamosas, de los cuales la histología serosa es la más frecuente (75 – 80 %)
- Tumores de células germinales; menos del 5% de todos los tumores ováricos. Derivan de las células encargadas de producir los óvulos y se observan más a menudo en mujeres jóvenes.
- Tumores de células del estroma; cerca del 1% de todos los tumores ováricos. Derivan de las células del tejido conectivo encargadas de producir estrógenos y progesterona.

La causa exacta de los tumores de ovario es aún desconocida, aunque entre las diversas teorías se admite que la ovulación incesante con los fenómenos de cicatrización consiguientes en la superficie del ovario, puede ser una explicación. También se ha admitido la posible

relación con procesos inflamatorios crónicos o el ambiente hormonal, como por ejemplo los andrógenos en el síndrome del ovario poliquístico (SOP) o la elevación de las gonadotropinas en la menopausia.

El principal factor de riesgo del cáncer de ovario es presentar antecedentes familiares positivos (por vía materna o paterna). Según la American Cancer Society, entre un 5% y un 10% de cánceres de ovario se desarrolla por la existencia de una predisposición genética hereditaria.

El riesgo de desarrollar cáncer de ovario está aumentado en mujeres con antecedentes personales de cáncer de mama. El riesgo también es mayor si la mujer no ha tenido hijos, si toma fármacos para aumentar la fertilidad, si es o ha sido obesa, o bien, si recibe un tratamiento hormonal sustitutivo.

Las mutaciones en los genes *BRCA-1* y *BRCA-2* se asocian con un riesgo significativamente aumentado de desarrollar cáncer de ovario. En el caso de *BRCA-1* se estima que el riesgo es de 35-70% y en el de *BRCA-2* del 10-30%.

Por otro lado, el riesgo es menor si existen antecedentes de ligadura de trompas, si se han tomado contraceptivos orales, si se han tenido hijos y se les ha amamantado o, bien, si se sigue una dieta baja en grasas.

El cáncer de ovario puede causar diferentes signos y síntomas, aunque suelen ser bastante inespecíficos lo que dificulta el diagnóstico. Los más comunes son:

- Distensión abdominal.
- Dolor abdominal o pélvico.
- Dificultad para ingerir alimentos o sensación rápida de saciedad.
- Síntomas urinarios, tales como urgencia (sensación constante de tener que orinar) o frecuencia (tener que orinar a menudo).
- Problemas estomacales.
- Dolor de espalda.
- Dolor durante las relaciones sexuales.
- Estreñimiento.
- Cambios en el período menstrual de la mujer, tales como un sangrado más profuso de lo normal o sangrado irregular.

Se sigue buscando la mejor estrategia para alcanzar un diagnóstico precoz del cáncer de ovario, que sea aplicable a mujeres asintomáticas. Ganan cada vez más importancia las pruebas moleculares y las que combinan varios marcadores tumorales. Los marcadores tumorales se definen como

sustancias de carácter bioquímico producidas por las células tumorales o por el huésped, cuya presencia puede ser detectada en el suero u otros líquidos biológicos, y que es susceptible de utilizarse en la detección precoz, diagnóstico, pronóstico, diagnóstico precoz de recidivas o control evolutivo del tumor.

El marcador tumoral ideal debería reunir las siguientes características:

- Ser una sustancia producida por la célula neoplásica o cuya regulación esté bajo su control.
- Estar presente en los tumores o ser secretados por ellos.
- Ser específico.
- Ser detectable en sangre.
- Ser cuantificable de forma fácil y reproducible.
- No estar regulado por procesos no tumorales.
- Correlacionarse con el desarrollo de la lesión maligna (tamaño y grado de diferenciación del tumor).

El problema reside en que la mayoría de los marcadores tumorales conocidos en la actualidad no cumplen todos estos requisitos, no existiendo marcadores tumorales específicos, aplicables al diagnóstico temprano de la enfermedad tumoral. Además, no son sintetizados exclusivamente por el tumor maligno, sino que también puede detectarse en suero y en diversos líquidos biológicos en otros procesos fisiopatológicos, dando lugar a posibles falsos positivos.

Mientras no se disponga de un método fiable que garantice la detección precoz del cáncer de ovario entre mujeres asintomáticas, se recomienda someterse a exámenes pélvicos y físicos completos, valorando posibles síntomas y antecedentes familiares. Este examen se puede complementar con diferentes estudios:

1. Ecografía pélvica y/o transvaginal: permite detectar un aumento del tamaño del ovario y saber si dicho aumento es atribuible a un tumor o a un quiste benigno.
2. Tomografía computarizada (TAC).
3. Resonancia magnética nuclear (RMN)
4. Pruebas de laboratorio: marcadores tumorales.

En cuanto a las pruebas de laboratorio, pueden solicitarse, pruebas genéticas, con el objetivo de estudiar las posibles mutaciones de los genes *BRCA-1* y *BRCA-2* o el estudio sérico de determinados marcadores tumorales. Para los COE, el marcador clásico es el antígeno carbohidratado 125 (CA125) que se encuentra elevado en el 80% de los cánceres epiteliales, pero es un marcador poco sensible en los primeros estadios de la enfermedad además de poco específico, elevándose en otro tipo de patologías ginecológicas benignas, de ahí que más recientemente se haya incorporado el marcador HE4 (del inglés *Human epididymis protein 4*) o proteína epididimaria. Para complementar el diagnóstico, se pueden determinar el antígeno carcinoembrionario (CEA) o el antígeno

carbohidratado 19-9 (CA19-9), siendo este último más específico para los cánceres epiteliales de histotipo mucinoso.

En cuanto a los tumores de células germinales se pueden emplear como marcadores, la alfafetoproteína (AFP), la lactatodeshidrogenasa (LDH) o la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG). Por su parte, la inhibina podría utilizarse como un marcador para los tumores de células del estroma.

En referencia al tratamiento, después de la recuperación de la cirugía, se usa una combinación de quimioterapia. La combinación más utilizada es carboplatino (o cisplatino) y un taxano, como paclitaxel (Taxol), administrada por vía intravenosa por 6 ciclos. El medicamento de terapia dirigida bevacizumab (Avastin) también se puede administrar con quimioterapia.

HE4

El HE4 es una proteína de 20kD descubierta por Kirschhoff en 1991 en el conducto epididimario, de donde recibe el nombre, presentando funciones inhibitorias de proteasas. Es una proteína N-glucosilada, que está codificada por el gen *WFDC2* ubicado en el cromosoma 20. Recibe también el nombre de *WFDC2*, ya que pertenece a una familia de proteínas conocidas como *WFDC* que se caracterizan por la presencia de cuatro núcleos unidos por puentes disulfuro. Esta proteína se identificó principalmente como una transcripción expresada exclusivamente en el epidídimo y relacionada con la maduración de los espermatozoides, pero se ha visto que se expresa fisiológicamente en diferentes regiones del tracto genitourinario, reproductor y respiratorio, siendo sobre expresada en algunos tejidos neoplásicos, como ocurre en el cáncer de pulmón y sobre todo en el cáncer de ovario. Por tanto, el HE4 se utiliza como un marcador para los cánceres de ovario epiteliales, sobre todo para histotipo seroso y endometrioide.

Respecto al CA125, el marcador más ampliamente usado para cáncer de ovario, el HE4 presenta una sensibilidad diagnóstica similar, excepto en los estadios precoces, donde la sensibilidad es mayor que el CA125, viéndose elevada en un 25% de casos en estadios iniciales (I-II). Además, la mayor ventaja del HE4 la observamos con su especificidad en patología ginecológica benigna, con falsos positivos sólo en el 4 % de los casos, frente al 43,3 % hallado con el CA 125, sobre todo en pacientes con endometriosis.

Los niveles del HE4 en sujetos sanos aumentan con la edad y el hábito de fumar y se han observado niveles elevados de HE4 en pacientes con enfermedad renal crónica que pueden deberse a una menor eliminación o una mayor producción de los túbulos renales dañados. Las concentraciones séricas elevadas del HE4 detectadas en pacientes con insuficiencia renal sugirieron claramente que HE4 debe interpretarse con cuidado en pacientes con insuficiencia renal. Esto es importante porque la insuficiencia renal aguda puede presentarse con frecuencia en algunos pacientes durante el tratamiento con quimioterapia. También pueden presentarse falsos positivos por causas de derrames, en las que los niveles del HE4 no suelen superar los 400 pmol/L, o por

hepatopatías, donde los niveles no acostumbran a ir más allá de los 200 pmol/L.

El HE4 se puede utilizar como marcador para el diagnóstico precoz, la monitorización de la enfermedad, así como para el estudio de la resistencia a la quimioterapia. Si una mujer a la que se le ha diagnosticado cáncer de ovario epitelial tiene una concentración inicial de HE4 normal, entonces esta prueba no es útil para monitorizar el seguimiento del cáncer de ovario. Una disminución de las concentraciones del HE4 después del tratamiento suele ser indicativa de una buena respuesta al tratamiento del cáncer epitelial de ovario. Si las concentraciones aumentan o no varían, probablemente el cáncer no habrá respondido al tratamiento. Un aumento progresivo, continuado y marcado de las concentraciones del HE4 durante la monitorización periódicamente realizada después del tratamiento o cirugía, sugiere una recurrencia del cáncer.

La resistencia a la quimioterapia es un problema desafiante en el tratamiento de pacientes con COE ya que mientras que la mayoría (80 %) de las mujeres responde inicialmente a la quimioterapia de primera línea con platino/taxano, la enfermedad recurrente se presenta en el 60-85 % de las pacientes y es fundamentalmente incurable. Las últimas investigaciones apuntan que los niveles séricos de HE4 y el índice ROMA (algoritmo del riesgo de malignidad ovárica) son predictores más sensibles de la respuesta del platino que el CA125 solo.

Para la medición del HE4 se utilizan métodos de inmunoanálisis con sistemas automatizados que permiten resultados en un corto periodo de tiempo. Se pueden utilizar tres tipos de métodos:

- ECLIA (inmunoensayo de electroquimioluminiscencia)
- CLEIA (inmunoensayo enzimo quimioluminiscente en fase sólida)
- CMIA (inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas)

El principal problema es que no hay intercambiabilidad de resultados obtenidos por diferentes sistemas analíticos debido al uso de diferentes anticuerpos monoclonales en los diversos ensayos y al efecto matriz en cada uno de ellos.

El método utilizado en el laboratorio del Hospital Universitario 12 de Octubre es el inmunoanálisis electroquimioluminiscente (ECLIA) de Roche Diagnostics®. Se trata de un inmunoanálisis tipo sándwich (inmunométrico) que usa un anticuerpo monoclonal de captura biotinilado que se une a micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina y un segundo anticuerpo monoclonal trazador marcado con un quelato de rutenio. El complejo formado por el HE4 y los dos anticuerpos se fija a un electrodo gracias al magnetismo de las partículas, y se aplica una diferencia de potencial, que provoca la emisión de una radiación luminiscente que es detectada por un fotomultiplicador. Los rangos de medición para HE4 con ECLIA son 15,0–1500 pmol/L.

Los valores de HE4 varían en función de la edad, con menores concentraciones en mujeres jóvenes que en

pacientes de edad avanzada, aumentando significativamente en mujeres mayores de 65 años, posiblemente por el deterioro de la función renal o debido a diversas comorbilidades como posibles explicaciones (ver Figura 1). Teniendo esto en cuenta el rango de referencia del HE4 para el seguimiento de las pacientes tratadas se debe definir con diferentes puntos de corte en función de la edad buscando el menor número de falsos positivos y una mayor sensibilidad.

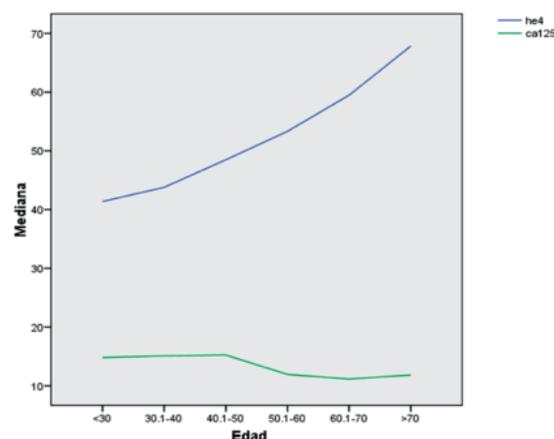


Figura 1. Distribución del HE4 y del CA125 en mujeres sanas en función de la edad. Tomado de: Escudero JM Molina R et al, 2015.

En el laboratorio del Hospital Universitario 12 de Octubre se emplea 70 pmol/L como límite de normalidad en mujeres de menos de 40 años, 100 pmol/L en mujeres de 40 a 50 años, 120 pmol/L en pacientes de 50 a 65 años y 150 pmol/L en mayores de 65 años.

ÍNDICE DE RIESGO DE MALIGNIDAD (IRM)

Para mejorar la validez de CA125, el índice de riesgo de malignidad (IRM) fue desarrollado 1990. El IRM utiliza un enfoque multimodal que combina el resultado de CA125 con hallazgos de ultrasonido (U) y estado menopáusico (M), para calcular un índice de puntuación que ayuda a predecir el riesgo de cáncer de ovario en mujeres que presentan una masa anexial. Se calcula con la fórmula: $IRM = U \times M \times CA125$, que tiene una sensibilidad del 85.4% y especificidad del 96.9%, con un punto de corte de 200 para indicar malignidad.

- Calificación ecográfica (U): 1 punto por la presencia de cada uno; quiste multilocular, zonas sólidas, ascitis, metástasis, lesiones bilaterales, con un máximo de 5 puntos.
- Estado menopáusico: 1 punto para premenopáusicas y 3 para postmenopáusicas (definida como ninguna menstruación durante más de un año o como una mujer de más de 50 años que ha sido sometida a una histerectomía)

Posteriormente ha sido actualizado este índice en diferentes versiones intentando mejorar la sensibilidad del mismo. En 2009 se incluyó también en la fórmula el tamaño del ovario, aumentando el punto de corte hasta 450.

ÍNDICE ROMA

En 2011, la FDA aprobó el algoritmo del riesgo de malignidad ovárica (ROMA) como un índice para evaluar si una mujer que presenta una masa anexial ovárica tiene una probabilidad alta o baja de encontrar una neoplasia maligna en la cirugía. Es una prueba cuantitativa que combina HE4, CA125 y el estado menopáusico; presenta una sensibilidad diagnóstica de 88.9% en pre-menopausia y 94.6% en post-menopausia y una especificidad del 75% para el diagnóstico de COE.

- **Cálculo del índice predictivo (IP):**

- Pre-menopáusicas:

$$IP = -12,0 + 2,38 * \ln[HE4] + 0,0626 * \ln[CA125]$$

- Post-menopáusicas:

$$IP = -8,09 + 1,04 * \ln[HE4] + 0,732 * \ln[CA125]$$

LN = logaritmo neperiano

- **Valor ROMA (%) = $\exp(IP) / [1 + \exp(IP)]$**

- Pre-menopáusicas:

Valor ROMA < 11,4 % = bajo riesgo de encontrar cáncer epitelial de ovario.

Valor ROMA > 11,4 % = alto riesgo de encontrar cáncer epitelial de ovario.

- Post-menopáusicas:

Valor ROMA < 29,9 % = bajo riesgo de encontrar cáncer epitelial de ovario.

Valor ROMA > 29,9 % = alto riesgo de encontrar cáncer epitelial de ovario.

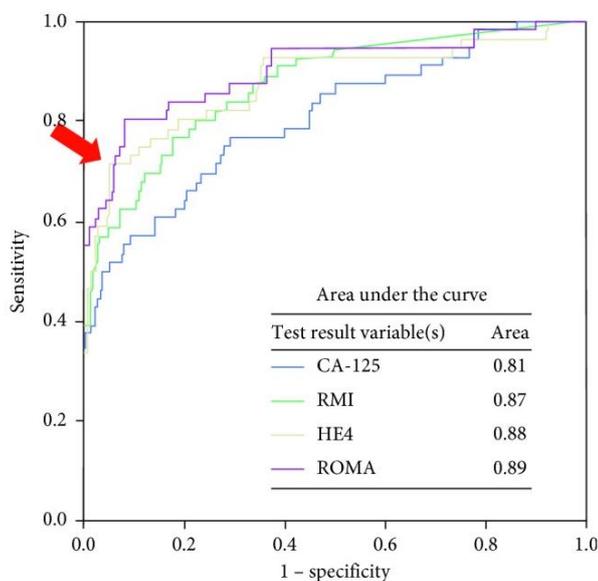


Figura 2. Curva ROC comparativa entre ROMA, HE4, IRM y CA125. Tomado de: Dochez V et al, 2019.

En la curva ROC que evalúa la utilidad de los niveles séricos del HE4, CA 125, ROMA e IRM en el diagnóstico de cáncer de ovario comparando pacientes con cáncer de ovario y aquellas con enfermedades ginecológicas benignas, el algoritmo ROMA mostró un área bajo la curva ligeramente más alta que el HE4 y ambos son significativamente más altos que IRM y CA125. (Ver figura 2)

La utilidad del ROMA va evolucionando hacia su uso condicional para obtener los mejores resultados. Si el HE4 es positivo, el riesgo de COE es alto independientemente del ROMA. Si el HE4 está por debajo del corte de referencia, añadir el CA125 y realizar el cálculo del ROMA permite mejorar la sensibilidad, sobre todo en mujeres mayores de 40 años, mucho menos en menores de 40 años en las que la incidencia de COE es mucho menor, la mayoría de origen mucinoso.

HE4 EN ORINA

Debido a la facilidad de recolección de la muestra, detectar marcadores tumorales en orina se ha convertido en un objetivo prometedor en el control oncológico. Varios estudios empiezan a evaluar la utilidad de la orina para detectar HE4. Estos estudios confirman que la sensibilidad de HE4 en suero y orina es similar, excepto en las primeras etapas de la enfermedad donde la sensibilidad es mayor en orina. Los estudios longitudinales en pacientes tratados indican que el HE4 es detectable en la orina antes que en el suero¹. Los niveles de HE4 en orina también demuestran una relación con la resistencia primaria al platino que no es evidente en los niveles séricos. Todo ello sugiere que la orina puede ser una mejor vía para detectar o monitorear esta enfermedad. Si estos hallazgos se pueden confirmar con más estudios y en una cohorte más grande, sería muy significativo ya que implicaría un paso adelante en la detección y seguimiento de la enfermedad.

A diferencia del HE4 en suero, el HE4 en orina fluctúa con el volumen; la medición de creatinina (CRE) se usa como estándar interno para normalizar la proporción del HE4. Se ha encontrado que la proporción de HE4/CRE es mejor predictor de cáncer de ovario en etapa temprana y tardía que solo el HE4 en orina.

Un reciente estudio² ha desarrollado un Kit de uso fácil y casero para que las mujeres desde su casa puedan medir el ratio HE4/ CRE. Se trata de pruebas de papel, como el ensayo de flujo lateral (LFA), ensayo inmunocromatográfico de tira reactiva, que se basan en una reacción colorimétrica que el ojo humano puede leer como un simple resultado: positivo/negativo.

Tanto el HE4 como la creatinina están presentes en grandes cantidades y son fácilmente detectables en la orina, por lo que su detección no es una preocupación. Para la cuantificación del LFA, se requiere un instrumento óptico; como un scanner, que permita medir la cantidad de analito de una muestra y compararlo con una curva estándar de cantidades conocidas del analito, en este caso: el HE4 y la CRE. El estudio plantea una forma innovadora que es la utilización de los teléfonos móviles para realizar esta medición, debido a su portabilidad, bajo coste y uso generalizado.

Este tipo prueba sería útil en los países menos desarrollados, que se enfrentan a un rápido aumento de la incidencia del cáncer y en los que hay una menor infraestructura y capacitación. Otra aplicación de esta tecnología sería la posibilidad de monitorear las respuestas tempranas a la terapia. Mediciones seriadas de HE4 en orina muestran que los niveles medios de HE4 en orina permanecieron estables (disminución del 7 %) en pacientes que demostraron ser resistentes al platino, mientras que disminuyeron un 68 % en aquellos que demostraron ser sensibles al platino. Esto indica que los niveles de HE4 en orina también pueden ser una herramienta útil para monitorear la recurrencia en pacientes con resistencia al platino. Por otro lado, se podría plantear el uso de estos kits de HE4 en orina como una herramienta más para la detección temprana en aquellas mujeres con un riesgo genético elevado.

Para la tira reactiva de HE4, el ensayo sándwich captura el biomarcador en el medio que es la línea de prueba. La línea de control se genera cuando se une el exceso de anticuerpo (ver figura 3). Para la tira de prueba de creatinina, se utiliza un sistema de dos reactivos para generar una reacción colorimétrica con creatinina de color púrpura claro a oscuro. La intensidad del color morado indica la concentración de creatinina (ver figura 4). Las dos tiras se colocan en un escáner o casete para que el teléfono las pueda leer.

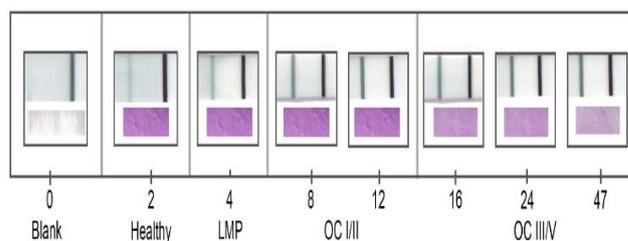


Figura 4. Proporciones de pacientes clínicos simulados de HE-4/CRE urinario. Tomado de: Kight E et al, 2021.

CASO CLÍNICO

Mujer de 65 años, no fumadora, con antecedentes de HTA y cáncer de colon tratado quirúrgicamente hace siete años, que consulta por fatiga y distensión abdominal de tres meses de evolución. En la ecografía abdominal se observa una masa pélvica.

Se observan los siguientes datos de laboratorio:

Parámetro	Resultado basal	Intervalo normal
Creatinina	1.05	<1.03 mg/dL
AST/ALT	25/36	<45 U/L
CEA	4.2	<5 ng/mL
CA125	456	<35 U/mL
HE4	907	<120 pmol/L

Tabla 1. Resultados de análisis de suero de nuestro caso. Adaptado de: Escudero JM, Molina R et al, 2015.

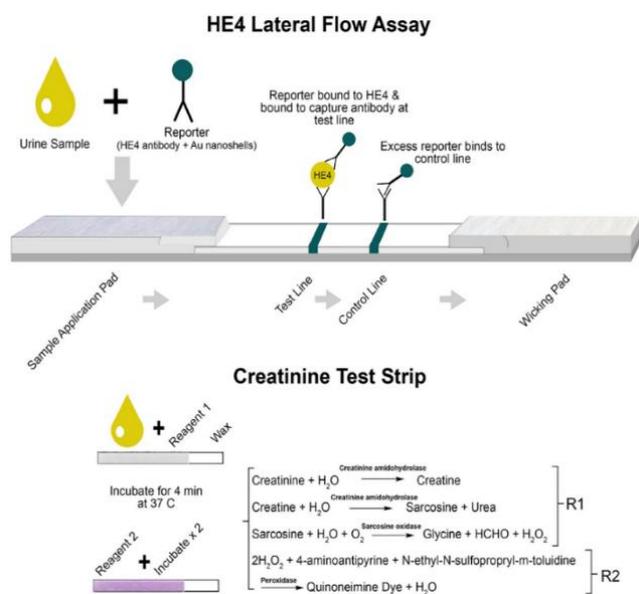


Figura 3. Esquema de las dos tiras reactivas de papel y sus componentes. Tomado de: Kight E et al, 2021.

En la figura 4, cada imagen muestra una tira de flujo lateral, LFA (parte superior) y la tira de creatinina (parte inferior). En la tira LFA, la banda izquierda es la línea de prueba y la banda derecha es la línea de control. A medida que se pasa de una situación de salud a un quiste de bajo potencial de malignidad (LMP, *low malignancy potencial cyst*) y a un mayor grado de cáncer de ovario, el ratio HE4/CRE aumenta.

La concentración basal de CA125 y, sobre todo, de HE4 indican con alta probabilidad cáncer de ovario. La presencia de estas concentraciones de HE4 y CA125 previas al tratamiento indica mal pronóstico de la paciente. No presenta insuficiencia renal, hepatopatía o derrames que pudieran afectar la especificidad del HE4. La negatividad del CEA apoya este diagnóstico en contraposición a la posible recidiva de su cáncer de colon.

La paciente es diagnosticada de cáncer de ovario seroso de alto grado (estadio III). Se le somete a cirugía citoreductora y posterior quimioterapia con carboplatino-paclitaxel por seis ciclos. El TAC realizado tras el fin de la primera línea de quimioterapia mostró persistencia de las lesiones pélvicas e implantes peritoneales que indican falta de respuesta al tratamiento, por lo que se inicia una segunda línea de quimioterapia con Cisplatino-Docetaxel por seis ciclos, tras los cuales tanto las pruebas de laboratorio como de imagen no muestran persistencia tumoral. En el TAC de seguimiento a los dos años de finalizar la segunda línea de quimioterapia se observa la presencia de infiltrados en ambas bases pulmonares que son consideradas metástasis pulmonares, por lo que se decide iniciar una tercera línea de tratamiento quimioterápico con Vinorelbina. La paciente fallece treinta meses después del diagnóstico.

Determinación	HE4 (<120 pmol/L)	CA125 (<35 U/mL)
Post 3º ciclo quimioterapia-1	851	502
Fin quimioterapia-1	952	465
Fin quimioterapia-2	84	32
6 meses *NEE	75	33
12 meses NEE	92	72
13 meses NEE	82	32
22 meses NEE	421	152
Post 3º ciclo quimioterapia-3	1542	552

*NEE: No evidencia de enfermedad

Tabla 2. Resultados de los análisis de marcadores tumorales HE4 y CA125 tras los distintos tratamientos recibidos. Adaptado de: Escudero JM, Molina R et al, 2015.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

- Meng-Meng J, Jie D, Cheng X, Yan Z et al. Diagnostic accuracy of urine HE4 in patients with ovarian cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. [Internet]. 2017; 8, (6): 9660-9671. PubMed, disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28039447/>
- Kight E, Hussain I, Bowden AK, Haselton FR. Recurrence monitoring for ovarian cancer using a cell phone-integrated paper device to measure the ovarian cancer biomarker HE4/CRE ratio in urine. *Scientific Report*. [Internet] 2021; 11, 21945. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-01544-4>

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- American Cancer Society. Ovarian Cancer. [Internet] Disponible en: <http://www.cancer.org/cancer/ovariancancer/index>
- Cáncer de ovario. LabTests [Internet]. Disponible en: <https://labtestsonline.es/conditions/cancer-de-ovario>
- Dochez V, Caillon H, Vaucel E et al. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *Journal of Ovarian Research*. [Internet] 2019; 12:28. PubMed, disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6436208/>

- Escudero JM, Molina R. Avances en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de ovario: HE4. *Lab Clín*.2015; 20: 99 – 108.
- Granato T, Grazia M, Longo P et al. HE4 in the differential diagnosis of ovarian masses. *Clinica Chimica Acta*. [Internet] 2015; 446:147-155. PubMed, disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25892674/#:~:text=Recently%2C%20HE4%20has%20been%20proposed,and%20management%20of%20ovarian%20cancer.>
- Liao JB, Yip YY, Swisher EM, Agnew K et al. Detection of the HE4 protein in urine as a biomarker for ovarian neoplasms: clinical correlates. *Gynecol Oncol*. [Internet] 2015 Jun; 137(3): 430–435. PubMed, disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25866324/>
- Martin JL, Bustos F. Características operativas del método de electroquimioluminiscencia para la medida de la proteína epididimaria humana (HE4) en el analizador Cobas e411 (Roche Diagnostics®). *LabClin*. [Internet] 2016:108-114. Elsevier, disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-del-laboratorio-clinico-282-articulo-caracteristicas-operativas-del-metodo-electroquimioluminiscencia-S1888400816300320>
- Ribeiro J, Schorl C, Yano N, Romano N, Kim K, Singh NK, Moore RG. HE4 promotes collateral resistance to cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer cells. *J Ovarian Res*. [Internet] 2016; 9: 28. PubMed, disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4869286/>
- Suh KS, Park SW, Castro A, et al. Ovarian cancer biomarkers for molecular biosensors and translational medicine. *Expert Rev Mol Diagn*. [Internet] 2010;10(8):1069–1083. PubMed, disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/erm.10.87?journalCode=iero20>
- Van-gorp T, Cadron I, Despierre A, Leunen K, Amant F, Timmerman D, De Moor B, Vergote I. HE4 and CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. *Br J Cancer*. [Internet] 2011 Mar 1; 104(5): 863–870. PubMed, disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21304524/>

ORGANIZACIÓN PREANALÍTICA

Autor: Sara Peral García; José Miguel Comino Cáceres

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

Palabras clave: Preanalítica, variabilidad, gestión de muestras

INTRODUCCIÓN

Los resultados analíticos obtenidos en un laboratorio clínico han de ser fiables, reproducibles y deben satisfacer las necesidades por las cuales fueron solicitados. Por tanto, debe asegurarse que estos sean válidos, ya que pueden afectar notablemente su interpretación. En torno al 70%-80% de las decisiones clínicas son determinados por los datos que el laboratorio proporciona al clínico. La calidad de los métodos analíticos empleados juega un papel decisivo, sin embargo, de la confección de la solicitud de análisis, de la preparación del paciente y de los cuidados para la obtención de las muestras, depende también la calidad de los resultados. Estos factores componen lo que se denomina fase preanalítica. La atención que el personal asistencial y el personal del laboratorio concedan a esta fase, determinará en gran medida, la calidad de los resultados que se van a obtener.

La fase preanalítica se divide en:

- Etapa preanalítica extra-laboratorio: desde la petición de los análisis hasta la llegada de las muestras al laboratorio. Etapa con mayor probabilidad de provocar un efecto adverso, incluye los procesos más difíciles de controlar por la gran complejidad y número de profesionales implicados.
- Etapa preanalítica intra-laboratorio: desde la llegada de las muestras al laboratorio hasta justo antes de comenzar la fase analítica.

La Asociación Mundial de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio considera que actualmente la fase preanalítica es responsable del 70 % al 90 % de los errores atribuibles a los laboratorios, lo cual se debe ver como un problema, pero también como una oportunidad de mejora.

CAUSAS DE VARIABILIDAD

Las magnitudes biológicas están sometidas a dos tipos de variabilidad; la variabilidad biológica y la analítica, responsables de que los valores de un determinado parámetro sean diferentes entre individuos y de que incluso en una misma persona difieran en el tiempo.

• Variabilidad biológica

Aun siendo conocidos o teniendo controlados experimentalmente los factores causantes de la variación preanalítica y analítica, es un hecho que para una magnitud concreta los valores observados en diferentes individuos son distintos. También se observa que una misma magnitud

repetida en un mismo individuo en diferentes momentos del día o de su vida arrojará diferentes resultados, cuyas diferencias no son imputables únicamente a factores preanalíticos y al error analítico. Esta variación es conocida como variación biológica.

La variación biológica intraindividual, describe el fenómeno por el cual los resultados de las magnitudes biológicas varían en un individuo de un momento a otro. La variación puede suceder a corto o largo plazo, y su origen puede ser:

- Sistemático: fundamentalmente relacionados con los ritmos biológicos o con la edad debido a las modificaciones que comporta el crecimiento o el envejecimiento.
- Aleatorio: causado por las variaciones metabólicas relacionadas con la homeostasis. La variación es tanto menor cuanto más estrecho sea el control o la regulación metabólica del analito. También forman parte del componente aleatorio las variaciones introducidas por la dieta, clima, estados emocionales, etc.

Si la magnitud biológica tiene una variación biológica intraindividual muy pequeña (equilibrio homeostático muy ajustado), como, por ejemplo, el calcio, una mínima diferencia entre dos resultados seriados puede ser significativa; en cambio, si la magnitud tiene una variación biológica intraindividual alta, como la amilasa, la diferencia entre dos resultados seriados ha de ser mucho mayor para que tenga el mismo nivel de significación.

La variación biológica interindividual, justifica por qué los valores medios de una magnitud concreta son diferentes entre los distintos individuos de una población. Este componente existe en todas las poblaciones, y determina la necesidad de calcular en cada una de ellas sus propios valores de referencia. Los factores que con más frecuencia causan este tipo de variación en las magnitudes de laboratorio son: la edad, la raza, el sexo, el ciclo menstrual, la gestación, la lactancia, la menopausia, la alimentación, el ejercicio físico, la masa muscular, la obesidad, la localización geográfica, etc.

El conocimiento de la variación biológica en el laboratorio clínico, tiene una importancia extrema porque resulta imprescindible para la interpretación correcta de los resultados de las pruebas de laboratorio. En general cuando la variación biológica intraindividual sea mayor que la interindividual, los valores de referencia poblacionales son de utilidad, mientras que en el caso contrario son de uso limitado y pueden llevar a errores de interpretación.

- **Variabilidad analítica**

La variabilidad analítica engloba a todos aquellos factores que pueden afectar al espécimen durante todo el proceso analítico. Se entiende como “proceso analítico” al conjunto de procedimientos que tienen lugar desde la solicitud del análisis y preparación del paciente hasta que el informe llega al médico que lo solicitó. Está dividido en tres fases:

- Preanalítica: comprende la fase desde la preparación del paciente y toma de muestra hasta la preparación de ésta para su análisis.
- Analítica: abarca todos los procedimientos relacionados con la medida de la magnitud que se estudia.
- Postanalítica: incluye la elaboración del informe analítico y envío al médico solicitante.

VARIABILIDAD PREANALÍTICA

Son diversos los factores que pueden influir en la calidad de la muestra y que han de conocerse para interpretar correctamente el resultado final. Estos factores deben ser conocidos por todos los profesionales que intervienen en el proceso, tanto por los médicos (de forma que puedan interpretar correctamente el informe analítico), así como por el personal de extracciones, que será consciente de la trascendencia que puede tener una incorrecta obtención del espécimen.

1. Factores fisiológicos

- Edad: algunas magnitudes presentan diferentes valores según la edad, por lo que es importante conocer la edad del paciente para poder interpretar correctamente un resultado. Ej.: Una fosfatasa alcalina con niveles patológicos para un adulto es normal para un niño en edad de crecimiento; el número de hematíes, hemoglobina y hematocrito se encuentra más elevado en neonatos que en adultos; los niveles normales de PSA son superiores en ancianos mayores de 65 años, etc.
- Raza: algunas magnitudes pueden verse influidas por la raza. Así la raza negra tiene significativamente disminuida la concentración de leucocitos en la sangre comparada con la raza blanca. Esta diferencia se explica fácilmente por una reducción de la concentración de granulocitos. Se ha observado una diferencia importante en la actividad o concentración catalítica de creatinina en el plasma para ambos géneros entre personas negras y blancas. Esta diferencia no es debida a diferencias en la edad, la altura o la masa corporal.
- Sexo: algunas magnitudes como CK, mioglobina, creatinina, ácido úrico etc., presentan diferencias según el sexo del paciente.
- Embarazo: En el transcurso de un embarazo normal, el volumen medio de plasma aumenta desde aproximadamente 2600 mL a 3900 mL, por lo que diversas magnitudes se ven afectadas por un

efecto de “dilución” producido por el aumento del volumen plasmático. Además se produce un incremento de los niveles séricos de lípidos (colesterol, triglicéridos, etc.).

- Ciclos biológicos: es importante informar sobre el momento del ciclo en que se extrae la muestra ya que ciertos parámetros pueden variar siguiendo ritmos biológicos. Así, las hormonas sexuales varían a lo largo del ciclo menstrual (FSH, LH, estradiol, etc.), hormonas como el cortisol se ven afectadas por el ritmo circadiano, presentando un pico máximo a las 8 h y un pico mínimo a las 20 h, o la hormona del crecimiento aumenta por la noche.
- Estación: algunos parámetros varían según el periodo estacional. Así, los niveles de vitamina D se incrementan en verano.
- Altura: algunos parámetros como la hemoglobina aumenta con la altura.
- Estilo de vida: el tipo de dieta, consumo de café, el ejercicio, alcohol (aumentando la GGT y transaminasas) o el tabaco, también son variables fisiológicas a tener en cuenta.

Una dieta rica en grasas conduce a un aumento de la concentración de triglicéridos en el suero. En contraste, se observan concentraciones elevadas de amoníaco, urea y urato durante una dieta rica en proteínas y nucleótidos. Por otra parte, la desnutrición y el ayuno pueden alterar las magnitudes de manera clínicamente relevante. Las reducciones de las concentraciones de prealbúmina y proteína enlazante de retinol en el plasma son indicadores tempranos de una dieta pobre en proteínas.

La cafeína aumenta la triacilglicerol-lipasa, llevando a incrementar hasta tres veces la concentración de ácidos grasos libres en plasma. También puede estimular la síntesis de renina o catecolaminas, siendo origen de posibles falsos positivos.

En cuanto al ejercicio, los cambios observados (p. ej. Incremento de la concentración de albúmina en el plasma) pueden en parte atribuirse al cambio de volumen desde el compartimento intravasal al intersticial o a la pérdida de volumen por sudoración. El incremento de la concentración de urato en el plasma es una consecuencia de la reducción de su excreción urinaria debida al aumento de la concentración de lactato en el plasma. El aumento de la concentración de creatinina en el plasma debido a la hipoxia depende de la preparación física, con un alto grado de variabilidad individual.

2. Factores que influyen en la toma de muestra

- Ayuno: como norma general se recomienda un ayuno de 8 horas previo a la extracción. Además, hay determinaciones que exigen una dieta especial en los días previos. En estos casos se proporcionará al paciente instrucciones claras.

- Tiempo de aplicación del torniquete: si se mantiene más tiempo de lo recomendable (1-2 minutos) puede producirse una hemoconcentración, con el consiguiente aumento de determinados parámetros. Al aplicar el torniquete venoso, la presión coloidosmótica se modifica temporalmente. Esto significa que el aumento de la presión de filtración sobre los capilares provoca un desplazamiento de agua y de sustancias de bajo peso molecular del espacio extracelular al intersticio celular. Las sustancias de peso molecular elevado no pueden atravesar la pared capilar, por lo que aumenta la concentración de la sangre. En cambio, la concentración de sustancias de bajo peso molecular disminuye. Tras 1 minuto de aplicación del torniquete venoso, los primeros valores comienzan a alterarse, teniendo repercusiones considerables, especialmente en el caso de valores con un intervalo de referencia reducido.
- Pacientes con sueros terapéuticos: se recomienda, en la medida de lo posible, que se extraiga la muestra del brazo opuesto al que se tiene la infusión.
- Anticoagulantes: es importante el uso del anticoagulante adecuado según la prueba a determinar (EDTA para hematimetría, citrato para coagulación básica, Heparina lio para determinaciones bioquímicas...). Además, se debe conocer la sal en la que se presenta el anticoagulante (sódica, potásica, etc.) y las interferencias que puede presentar en ciertos parámetros. Es fundamental mantener la proporción adecuada entre la cantidad de sangre y el anticoagulante, sobre todo en los tubos con citrato para coagulación, ya que si no se mantiene se invalida la muestra.

INTERFERENCIAS EN LAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Las pruebas analíticas del laboratorio clínico pueden verse afectadas por constituyentes endógenos de la misma muestra. Algunos de ellos pueden reconocerse por el color de la muestra (hemólisis, ictericia y turbidez), pero otros (drogas), requieren una información más detallada o un análisis directo. Las interferencias en un método analítico pueden provocar un resultado falso que no refleja la situación "in vivo".

• Hemólisis

La hemólisis in vitro es la principal causa de rechazo preanalítico de muestras de suero (el 40-70% de las muestras rechazadas) y consiste en la lisis de hematíes y otras células sanguíneas durante la fase preanalítica debido principalmente a factores relacionados con la flebotomía (excesivo tiempo de torniquete, punción traumática, mezclado excesivo o escaso de la muestra en el contenedor tras la extracción); aunque también al transporte de la muestra al laboratorio (agitación durante el transporte o

enfriamiento/calentamiento excesivo) o durante el procesamiento de la misma (inadecuada centrifugación).

Aunque la hemólisis in vitro es más frecuente que la hemólisis in vivo, es muy importante saber distinguir una de otra ya que la hemólisis in vivo deriva de una situación patológica (anemia hemolítica autoinmune, defectos eritrocitarios, hemoglobinuria paroxística nocturna, entre otras) y los parámetros alterados tienen relevancia clínica. Ante una muestra hemolizada, deben comprobarse las siguientes premisas y se sospechará de hemólisis in vitro si:

- Sólo una de las muestras se encuentra hemolizada.
- Si la concentración de bilirrubina, haptoglobina y reticulocitos se encuentra dentro de los intervalos fisiológicos. En el laboratorio de urgencias y ante casos dudosos, es recomendable generar estas pruebas si están disponibles.
- Pedir nueva muestra para confirmar resultados y descartar hemólisis in vitro.

Por el contrario, la hemólisis in vivo, se caracteriza por el aumento paralelo de hemoglobina, LDH y bilirrubina, descenso incrementado de haptoglobina y niveles normales de potasio. El suero/plasma no siempre tiene porque adquirir una coloración roja.

Los principales mecanismos de interferencia hemólisis in vitro son:

- Liberación del contenido intracelular al plasma: en una muestra afectada por la hemólisis, se incrementa falsamente y de forma más notoria: potasio, lactato deshidrogenasa (LDH) y aspartato aminotransferasa (AST).
- Efecto dilucional: constituyentes como el ion sodio, cloruro y albúmina se encuentran falsamente disminuidos debido a este efecto.
- Otros mecanismos: interferencias espectrales (falso aumento del hierro, lipasa); interferencias químicas (falsa disminución de la bilirrubina por la actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina que inhibe la formación de color del diazonio en el método de Jendrassik y Groof).

• Lipemia

Se define como la turbidez que puede detectarse visualmente en una muestra de suero/plasma debido a la acumulación de lipoproteínas, principalmente de las más grandes, como es el caso de los quilomicrones (QM) y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) de tamaño grande-medio.

Se asocia principalmente a la toma de muestra sin guardar el tiempo de ayuno recomendado en pacientes ambulatorios. En pacientes hospitalizados, la lipemia suele deberse a la toma de muestra tras la administración parenteral de infusiones lipídicas, como por ejemplo la nutrición parenteral, el propofol o fármacos liposomales (anfotericina B, doxorubicina). En menor medida, también puede ser causa

de situaciones patológicas como diabetes mellitus, pancreatitis, mieloma múltiple, hipotiroidismo o ciertos tratamientos (estrógenos, anticonceptivos o antiproteasas en infecciones de VIH).

Los principales mecanismos de interferencia de lipemia son:

- Dispersión de la luz: la abundante presencia de lípidos dispersa la luz en todo el espectro visual y en consecuencia se afectan con sesgo negativo las medidas realizadas por métodos espectrofotométricos. En mayor medida, las que se realizan a menores longitudes de onda (ej. Métodos en medida de glucosa, ALT, AST, que emplean cambios en la concentración de NADPH+ medidos a 340 nm).
- Desplazamiento del agua: en una muestra lipémica, al aumentar la proporción de lípidos en el plasma, constituyentes como los electrolitos que se distribuyen en la fase acuosa, pasan a ocupar un menor volumen (de hasta el 75%) por lo que métodos como la potenciometría indirecta que emplean la dilución de la fase acuosa para extrapolar la medición al volumen total del plasma (incluida la fase lipídica), infravaloran la concentración de los mismos dando lugar a fenómenos de pseudohiponatremia y pseudohipopotasemia.

- **Ictericia**

Una muestra icterica se caracteriza por una intensa coloración amarilla del plasma debido a patologías que cursan con incrementos de bilirrubina superior a 100 $\mu\text{mol/L}$. El mecanismo de interferencia puede ser tanto químico como espectral y puede afectar a resultados analíticos de albúmina, colesterol, triglicéridos, glucosa y proteínas totales. La bilirrubina puede interferir actuando como una sustancia reductora.

- **Anticuerpos heterófilos**

Pueden originar interferencias sobre el analito o sobre el proceso de medición (reacción antígeno-anticuerpo).

- **Fármacos**

Pueden producir interferencias en la medida de diversos analitos.

ETAPAS DE LA FASE PREANALÍTICA

Las etapas de la fase preanalítica comprenden desde la solicitud del análisis por parte del facultativo peticionario hasta el procesado, centrifugación y distribución de la muestra.

- **Solicitud de análisis**

Es imprescindible que en la solicitud se encuentren correctamente cumplimentados varios tipos de datos:

- Identificación inequívoca del paciente.
- Identificación del facultativo peticionario.

- Descripción de la muestra y procedencia anatómica, si procede.
- Las pruebas analíticas/magnitudes solicitadas.

- **Extracción de muestras**

La obtención de muestras es uno de los momentos críticos del proceso.

Se recomienda:

- Registrar los datos de la identificación de la persona que realiza la extracción de la muestra, la hora y la fecha de la misma (la petición analítica electrónica facilita este registro), así como las incidencias que se hayan producido.
- Utilizar un sistema de identificación inequívoca del paciente y de sus muestras primarias, alícuotas y su petición analítica de tal manera que asegure relación unívoca entre muestras y paciente, es decir, la trazabilidad de estas.
- Asegurar que se definen las responsabilidades en la toma de muestras y su transporte cuando la obtención de muestras se realiza por personal ajeno al laboratorio.
- Documentar las situaciones posibles que se pueden plantear: gestión de muestras recogidas por el propio paciente (orina, heces, semen, etc.), la identificación de los distintos tiempos de una prueba funcional, extracciones en los domicilios.

El orden recomendado de llenado de tubos es el siguiente:

1. Frasco hemocultivo: se debe realizar la extracción con asepsia quirúrgica, desinfectar la piel con antiséptico (povidona yodada o clorhexidina) y utilizar guantes estériles. El orden de extracción de hemocultivos depende del sistema utilizado: si se utiliza un sistema cerrado (por ejemplo, "palomilla") primero inocular la botella aerobia; si se utiliza un sistema abierto (jeringuilla), inocular primero la botella anaerobia.

2. Tubo con anticoagulante citrato: para realizar el estudio de coagulación, la proporción entre citrato:sangre debe ser 1:9 y para determinar la velocidad de sedimentación, 1:4. Para que esta relación se cumpla, la muestra debe alcanzar un nivel situado entre la parte inferior y superior de la marca del tubo de coagulación. De no ser así, la proporción de citrato se vería alterada, generando modificaciones en los resultados:

- Si se recoge menor volumen (relación 1:7), el citrato en exceso forma complejos con el calcio, así, el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) y el tiempo de protrombina (TP) estarían falsamente incrementados.
- Si se llena en exceso, habría más plasma del que corresponde, disminuyendo por tanto la relación citrato: sangre y provocando un acortamiento de los tiempos.

Siguiendo las recomendaciones de la EFLM, cuando el tubo de coagulación es el primero a extraer o el único tubo, si se emplea un dispositivo como la “palomilla” para la extracción, se debe recolectar un tubo antes y descartarlo, para evitar un llenado insuficiente

3. Tubo de suero con activador de la coagulación, con o sin gel separador: al contener activadores para favorecer la adecuada formación del coágulo estos tubos siempre deben ser extraídos con posterioridad a los tubos con citrato, evitando interferencias en los resultados por arrastre de los activadores de la coagulación. Sin embargo, los que no tienen activadores de la coagulación pueden extraerse antes que los tubos de citrato.

4. Tubo con anticoagulante heparina: los más empleados son heparina de litio y heparina sódica: actúa a través de la antitrombina III inactivando los factores coagulantes IXa, Xa, XIa y XIIa, la trombina (factor IIa) y la proteína C y S, con lo que evita la conversión de fibrinógeno a fibrina. Como ventajas destaca que conserva el pH sanguíneo y se suele utilizar para perfiles bioquímicos en el laboratorio de urgencias (al llevar anticoagulante se puede centrifugar inmediatamente) y para la realización de cariotipo constitucional en sangre periférica (conserva las células viables para el análisis citogenético). En estos casos se recomienda que el tubo lleve heparina de sodio, ya que el litio dificulta la división celular.

5. Tubo con anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetracético): lleva EDTA sódico o potásico. Actúa como anticoagulante por ser quelante del calcio de la muestra. Se usa para la realización de hemogramas, estudio de células (mantiene la morfología celular), estudio de parásitos hemáticos y para biología molecular (estudios genéticos). No se usa para bioquímica porque interfiere con magnitudes enzimáticas (fosfatasa alcalina) y los iones Ca y K. Cabe destacar que, si no se alcanza un volumen de llenado adecuado, variaciones en la relación anticoagulante y muestra pueden provocar alteraciones en la forma y tamaño de hematíes, leucocitos y plaquetas, ya que aumenta la proporción de sales de anticoagulante que a su vez provocan un incremento de la osmolaridad.

6. Tubo con inhibidor de glucólisis: contienen fluoruro sódico (inhibidor de la glucólisis) en combinación con oxalato potásico (acción anticoagulante) y se emplea principalmente para la determinación de lactato y glucosa. El fluoruro sódico (NaF) es un aditivo que actúa inhibiendo el metabolismo celular de la glucosa a nivel de la enolasa, evitando la transformación de fosfoenolpiruvato en piruvato.

- **Transporte de muestras y almacenamiento**

Para el transporte de las muestras hay que seguir la reglamentación para el transporte normalizado de las muestras clínicas, teniendo en cuenta que dichas muestras clínicas se clasifican como N.o ONU 3373, categoría B y, por

lo tanto, deben ser transportadas mediante el sistema triple básico de embalaje. Se recomienda:

- Disponer de registros para el control de tiempo y temperatura en los transportes realizados desde los centros periféricos. Establecer las acciones a realizar en caso de que se superen los límites de tiempo y temperatura aceptables.
- El registro de la persona encargada del transporte y la hora de entrega de las muestras en el laboratorio.
- Registrar las incidencias ocurridas durante el transporte.

Las principales variables a tener en cuenta desde extracción periféricas son: agitación, exposición a la luz, temperatura, tiempo de transporte, colocación de los especímenes dentro del recipiente de transporte, tipo de embalaje e identificación de los mismos. Para el transporte de especímenes desde centros de extracción periférica se recomienda disponer de neveras provistas de dispositivos que permitan comprobar la temperatura durante todo el trayecto, así como un registro del tiempo transcurrido entre la extracción sanguínea y la llegada al laboratorio clínico. Se debe cuidar que no haya un exceso de agitación que pueda producir hemólisis de la muestra.

Se debe disponer de un sistema para monitorizar el tiempo de conservación de las muestras en el laboratorio antes de ser procesadas y para saber si en ese tiempo son correctas las condiciones de almacenamiento. Asimismo, se debe definir el tiempo durante el cual se han de conservar las muestras en el laboratorio para garantizar que cualquier problema en el procesamiento o en la interpretación de los resultados obtenidos pueda ser solucionado, recuperando la muestra para un nuevo procesamiento, si fuera necesario, o una ampliación antes de ser desechadas.

- **Procesado, centrifugación y distribución de muestras**

En primer lugar, se hace una recepción que supone la aceptación de la solicitud y las muestras. Para ello debe hacerse una inspección física de las muestras y su identificación, se controla el tiempo transcurrido desde la extracción y la temperatura a la que han permanecido las muestras.

Una vez aceptadas las muestras y solicitudes, las muestras deben ser clasificadas, centrifugadas en caso necesario, destaponadas, y si es necesario alicuotarlas. En cuanto a la centrifugación hay que tener en cuenta:

- Para aquellos estudios que se realizan en sangre total, como por ejemplo la hematimetría y la gasometría, no se centrifuga la muestra.
- Se ha de tener especial precaución en el caso de los líquidos biológicos, pues en primer lugar se realiza el recuento celular y a continuación se procedería a centrifugarlos para analizar los parámetros bioquímicos.
- En cuanto a los especímenes de orina, no se centrifugarán a no ser que se trate de una muestra muy

hemática que pueda interferir con los test bioquímicos a realizar. Para el sistemático no es necesaria su centrifugación. Si lo es en caso de tener que hacer la lectura del sedimento.

En el caso de las muestras sanguíneas, se recomienda que, el tiempo transcurrido entre la extracción y la llegada al laboratorio de una muestra sin centrifugar no supere las dos horas. La demora en la centrifugación supone un contacto continuo con las células, lo que podría provocar la degradación de determinados analitos por proteólisis, la difusión de elementos como el potasio hacia el exterior celular incrementando sus niveles o, debido al metabolismo celular producir un descenso o un aumento (amonio, lactato) en la concentración de los analitos.

Si se va a congelar la muestra antes de procesarla hay que tener en cuenta que la homogeneización inadecuada de las muestras congeladas después de la descongelación es una fuente muy común de error. Por tanto, después de la descongelación, la muestra deberá invertirse varias veces, evitando la formación de espuma.

TIPOS DE MUESTRA

- **Sangre Total**

Tubo con anticoagulante sin centrifugar. En este tipo de muestra se realizan estudios de gases y hematológicos.

- **Plasma o Suero**

Se obtiene tras centrifugar los especímenes, en función de si el tubo contiene anticoagulante o no.

SUERO	PLASMA
Tubo sin anticoagulante	Tubo con anticoagulante
Mayor riesgo de hemólisis	Menor riesgo de hemólisis
Centrifugación tras esperar a la formación del coágulo	Centrifugación inmediata
No contiene fibrinógeno	Contiene fibrinógeno. Se considera un interferente en algunas pruebas como el proteinograma y puede interferir en algunos inmunoensayos
Menor cantidad de sobrenadante tras la centrifugación	Mayor disponibilidad de sobrenadante (15-20% mayor que el suero)

Tabla 1: Principales diferencias entre suero y plasma.
Elaboración propia

- **Orina de primera micción**

El análisis sistemático de orina con sedimento urinario representa un alto porcentaje del total de análisis de orina que se solicitan al laboratorio de urgencias. Se recomienda recoger la muestra en recipientes estériles de plástico de boca ancha, sin conservantes ni aditivos y, a ser posible, que incorporen dispositivos de transferencia de la orina a tubos de recogida por sistema de vacío. No obstante, existen excepciones en las que debido a las condiciones del paciente este contenedor no puede emplearse: en lactantes y niños de corta edad se recurre al uso de una bolsa de plástico pediátrica que, a través de un adhesivo, permite que el niño miccione directamente en ella. En otras circunstancias y para evitar la contaminación de la orina, la recogida puede realizarse mediante punción suprapúbica o cateterismo de vejiga.

Se prefiere la orina de 1ª hora de la mañana ya que presenta una mayor osmolalidad, lo que refleja la capacidad que presenta el riñón para concentrar la orina. En esta orina de 1ª hora se encuentran más concentrados elementos como leucocitos, bacterias, cilindros, hematíes, optimizándose así el rendimiento diagnóstico de las pruebas de laboratorio. Además, presenta menores fluctuaciones en las determinaciones influidas por la dieta, actividad física, etc.

Se debe recoger la orina de la porción media de la micción (ya que está menos contaminada por las bacterias que son arrastradas por la primera parte de la micción). Se recomienda lavado previo de genitales externos con jabón y aclarado posterior con abundante agua (si la orina se contamina con jabón pueden verse afectados determinados parámetros como pH, o incluso el crecimiento bacteriano puede verse inhibido).

Las muestras se transportarán al laboratorio en el menor tiempo posible. Si el análisis se va a demorar más de dos horas el transporte deberá ser refrigerado (2-8°C), aunque esta medida puede producir la precipitación de uratos o fosfatos amorfos. Tanto para anormales y sedimento como para urocultivo la muestra debe procesarse en las 2-3 horas posteriores a su recogida, ya que algunos analitos pueden verse afectados.

- **Orina de 24 horas**

La orina recogida durante 24h se obtiene con el fin de conseguir una muestra homogénea y representativa de los analitos que se excretan a lo largo del día. Esta prueba es válida solamente si la recogida de orina incluye toda la orina de 24 horas. Si por alguna razón no entra en el recipiente alguna cantidad de orina emitida en este periodo puede que la prueba no sea exacta y tenga que repetirse otro día.

Los recipientes para recoger orina de 24 horas deben ser contenedores de plástico opaco con boca ancha, de 3 litros de capacidad, con escala graduada y con cierre seguro para evitar derrames. Se recomienda mantener la orina refrigerada durante el periodo de recogida de orina de 24

horas hasta su entrega en el laboratorio o en los puntos de extracción periféricos.

Para el alicuotado es necesario homogeneizar debidamente las orinas antes de obtener una alícuota que sea representativa del total de la muestra y especificar en el contenedor que se trata de orina de 24 h y anotar la diuresis.

En ocasiones es necesario añadir a la orina de 24 h determinados conservantes antes de comenzar el proceso de recogida con el fin de evitar el deterioro de algunos analitos:

- **Catecolaminas y Ácido 5-Hidroxiindolacético**

Las catecolaminas son importantes para el diagnóstico diferencial y seguimiento del feocromocitoma y neuroblastoma.

El Ácido 5-Hidroxiindolacético es importante para el diagnóstico del síndrome carcinoide secretor de serotonina.

Estos analitos sufren una rápida degradación durante las primeras 24h. La acidificación a un pH 4 es un método efectivo para evitar este efecto.

Dos días antes de la recogida de la orina, y durante la recolección de la misma (3 días en total), deben eliminarse de la alimentación los siguientes productos: Vegetales (berenjena, tomate) Verduras (brécol, espinacas, coliflor) Frutas: cítricos, plátanos, bananas, piña, kiwi, ciruela, aguacate Frutos secos (nueces) Chocolate, té, café (incluido descafeinado) Productos que contengan vainilla (galletas, helados, flanes, pasteles...)

Cada una de las micciones se recogerá orinando directamente sobre el frasco sin ácido y se trasvasará inmediatamente al frasco con ácido, con la precaución de no salpicar el ácido que puede producir quemaduras.

- **Ácido oxálico**

La formación de los cristales pocos solubles de oxalato o sales de calcio está considerado como un factor primordial en la urolitiasis.

Dos días antes de la recogida de la orina, y durante la recolección de la misma, deben eliminarse de la alimentación la vitamina C y alimentos que la contengan (principalmente fresas, cítricos, papayas, grosella negra, kiwi, pimientos, tomates, guayaba, coles de Bruselas, brócoli, coliflor, melones, acelgas, espinacas, berros, tomillo, albahaca, perejil, cilantro)

• **Heces**

En función de la magnitud a analizar deben cumplirse unas condiciones preanalíticas. Para la determinación de sangre oculta en heces, importante para la detección de enfermedades de la porción inferior del aparato digestivo,

que cursan con hemorragias, no deben recolectarse durante el periodo menstrual o ante la presencia de sangre en orina.

Para pruebas que solicitan varias muestras de heces (detección de parásitos, *Helicobacter pilory*, sangre oculta, etc), se recomienda remitir muestras de deposiciones de días distintos (algunos autores refieren que preferentemente días alternos).

Para el análisis de grasas en heces, importante para el screening de malabsorción, se requiere seguir una dieta grasa durante 6 días (añadir a la alimentación normal 50 gramos de mantequilla o margarina cada día) y en los 3 últimos días de la dieta recoger en el recipiente pesado las heces completas de esos 3 días.

• **Líquidos biológicos**

Todos los líquidos deben enviarse al laboratorio de urgencias para analizarse de inmediato, ya que rápidamente comienza la degeneración celular.

Para llevar a cabo el análisis bioquímico de los líquidos biológicos (pleural, sinovial, ascítico, peritoneal, pericárdico, etc.), por lo general se utilizan contenedores sin aditivos, aunque también se pueden emplear tubos de vacío con heparina de litio. Por otro lado, la muestra para realizar el recuento celular se debe enviar al laboratorio en tubos que contengan EDTA-K3 para prevenir la coagulación, en particular si se trata de una afección inflamatoria en la que el fibrinógeno y otros factores de coagulación pueden estar presentes.

La recolección suele realizarse en 3 tubos, siendo el orden de llenado óptimo:

- 1. Estudio bioquímico (heparina de litio).
- 2. Análisis microbiológico (contenedor estéril sin aditivos).
- 3. Recuento celular y diferencial (EDTA).

Sin embargo, dada la dificultad que en ocasiones puede suponer la extracción de este espécimen, sólo se dispone de un único tubo para realizar el estudio completo. En tal caso, se emplearán tubos de heparina de litio y sin la presencia de gel separador, ya que puede interferir en el recuento celular.

Por su parte, el líquido cefalorraquídeo (LCR) se recoge en tubo estéril sin aditivos, debido a que en esta muestra existe una baja concentración de células y proteínas que podría verse falsamente alterada por la presencia de aditivos.

• **Semen**

Entre las recomendaciones preanalíticas para obtener una mejor calidad del semen para estudios de fertilidad, destacan: guardar un periodo de abstinencia de 3-4 días (nunca superior a 7) , recoger toda la muestra directamente sin preservativo y mediante masturbación sobre el envase indicado, obtener la muestra en una sala anexa al laboratorio para asegurar el tiempo transcurrido desde la obtención, no

debiendo transcurrir más de una hora entre la recogida y la entrega de la muestra y no someter a la muestra a cambios de temperatura y realizar una adecuada entrevista al paciente (fundamentalmente preguntar si la recogida de muestra ha sido completa o no, si ha sufrido un proceso febril en los últimos días, medicación y hábitos tóxicos).

En caso de estudio post vasectomía el primer control se deberá realizar a los 4 meses tras la intervención quirúrgica y después de haber tenido, al menos, 24 eyaculaciones.

- **Gasometría**

Las muestras destinadas a gasometrías son especialmente sensibles a errores de tipo preanalítico. Una mala praxis en la obtención de la muestra venosa puede hacer que sólo se refleje el equilibrio ácido-base de una extremidad y no del organismo en su totalidad. Debe evitarse un uso prolongado del torniquete, ya que la anoxia tisular conducirá a alteraciones de ciertas magnitudes del equilibrio ácido base, con disminución del pH e incremento de la concentración de lactato. Antes del procesamiento de estas muestras es importante comprobar que no existe coágulo ni burbujas o cámaras de aire en la muestra. Además, ha de procesarse de inmediato a su llegada al laboratorio, de lo contrario, los valores tanto de pH como de los gases a medir pueden verse alterados por acción del metabolismo celular. Se debe garantizar la medición en los 30 minutos siguientes a la obtención de la muestra, si no es posible debería recogerse en recipiente de vidrio y almacenarse en hielo (0-4°C) hasta su análisis.

- **Muestras protegidas de la luz**

Por un lado, las porfirinas sufren una importante degradación (más de 50 % en 24 horas) por lo que las muestras biológicas para su análisis deben evitar la exposición de la luz.

Además, el retinol y la vitamina A son fotosensibles, por lo que la muestra debe protegerse de la luz inmediatamente después de la obtención para evitar su oxidación y así prevenir concentraciones falsamente bajas.

- **Muestras en hielo**

Debido a que, a temperatura ambiente, los eritrocitos exportan homocisteína al plasma, el aumento en la concentración de homocisteína puede prevenirse con la inmediata centrifugación y la separación de las células sanguíneas o con la colocación inmediata de la muestra de sangre en hielo hasta su centrifugación.

- La ACTH es rápidamente adsorbida por las superficies de cristal, y sometido a degradación por las proteasas del plasma. La extracción debe ser realizada en tubo de plástico, inmediatamente transferido a hielo y centrifugada a 4°C en la mayor brevedad posible, seguido de alicuotado y almacenado a -20°C, siendo la estabilidad de la muestra en este caso de 30 días.
- El lactato, piruvato, acetoacetato y el hidroxibutirato son metabolitos intermediarios presentes normalmente en

sangre, cuyas concentraciones relativas son una expresión del balance nutricional en el metabolismo energético.

- El amonio se recoge en contenedores con anticoagulante EDTA ya que la coagulación de la sangre aumenta el nivel de amonio. Se recoge con hielo para frenar la actividad celular en el tubo y evitar el aumento del nivel de amonio.

CALIDAD

El laboratorio clínico acreditado debe asegurar que el control y la gestión del proceso preanalítico cumple con los requisitos de la Norma UNE-EN ISO 15189:2013. Para ello, debe garantizar que todas aquellas actividades propias de la fase preanalítica no afectarán a: 1) los resultados obtenidos en el proceso analítico. 2) la trazabilidad de las muestras primarias, ni a 3) los aspectos relativos a la interpretación de los resultados.

Se recomienda:

- Diseñar un plan de control interno de la calidad del proceso preanalítico, mediante la implantación de indicadores.
- Seleccionar indicadores que aporten información trasladable a los objetivos de gestión del proceso, definiendo sus especificaciones, y que tengan en cuenta los puntos críticos en relación con la seguridad del paciente.
- Participar en un programa de evaluación externa de la calidad.
- El laboratorio debe disponer de documentación adecuada, controlada y disponible en todos los lugares necesarios. Esta documentación debe abarcar todas las fases del proceso preanalítico, solicitud, obtención de muestras, transporte, recepción de muestras y solicitudes, conservación y almacenamiento y debe distribuirse a todo el personal implicado: médicos peticionarios, pacientes, personal técnico de los centros de extracción y personal del laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Martínez Llamas M^o S, López Barba J, Hijano Villegas S, Orgaz Morales T, Díaz Portillo J. actualización de la fase preanalítica de los laboratorios clínicos del hospital "cruz roja" del ingesa de ceuta. Ministerio de sanidad y consumo. Instituto Nacional de Gestión Sanitaria; Junio 2007.
- Peña A, Giménez M^oL. Importancia de la fase preanalítica en el laboratorio. Ed. Cont. Lab. Clin 47: 119 – 130.
- Ruiz Martín G, Menchén Herreros A, Fernández Rodríguez E. Transporte De Muestras Clínicas, normativa. En: Asociación Española de Biopatología Médica. Actualizaciones en el Laboratorio Clínico. 2006.

- Suardíaz Espinosa M^o E, Aguirre Guillot J, Garciarena Peñate Q, Alonso Rodríguez Á. opinión Importancia de la fase preanalítica para el laboratorio clínico. Acta Médica. 2021;22(1):e167.
- Walter G, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. Samples: From the Patient to the Laboratory. 3^oEd. Weinheim: Wiley-VCH; 2003.

ORGANIZACIÓN POSTANALÍTICA

Autor: María Concepción Burgos Ballester; Fernando Calvo Boyero.

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

Palabras clave: índices séricos, informe de laboratorio, valores críticos.

FASE POSTANALÍTICA: DEFINICIÓN Y RELEVANCIA

El proceso global de laboratorio está constituido por una secuencia temporal de tres etapas: preanalítica, analítica y postanalítica. Esta última se inicia al obtener el resultado primario de la determinación analítica y finaliza con la emisión del resultado definitivo en el informe. Incluso se considera la diferenciación de una fase post-postanalítica que incluye la asesoría del facultativo de laboratorio al especialista clínico cuando es necesario. Es, por lo tanto, el último paso para la obtención y emisión de unos resultados fiables, veraces y consistentes mediante la revisión exhaustiva de los mismos permitiendo el cribado, diagnóstico o seguimiento del estado de salud del paciente, e incluyendo además el almacenamiento del material clínico, el desecho de la muestra y la preparación del informe de laboratorio.

Es bien sabido que el mayor porcentaje de errores dentro del proceso global de laboratorio ocurre en la fase preanalítica (48%), frente al 8% de los errores que ocurren en la fase analítica. Sin embargo, el elevado porcentaje de errores detectados en la fase postanalítica (45%), que casi iguala al de la fase preanalítica, hace que sea necesario establecer una serie de filtros que deben superar los resultados analíticos antes de emitirse en un informe¹.

INFORME DE LABORATORIO

Los informes de laboratorio del Hospital Universitario 12 de Octubre pueden ser visualizados en diferentes puntos de consulta: desde *Infinity* (Sistema Informático de Laboratorio o SIL); desde HCIS pinchando en el icono de resultados y en la pestaña "Laboratorio", desde "Vistas" y entrando en las peticiones resueltas o pendientes de ese paciente o desde "Historia clínica" y "Análisis de rejilla" seleccionando la especialidad y el tipo de búsqueda; y por último, desde la Intranet, en "Información por paciente", buscando con el número de historia clínica y en la pestaña "Laboratorios".

Según la norma ISO 15189:2013, los resultados de laboratorio deben notificarse de forma clara, exacta y sin ambigüedad. Además, el laboratorio debe definir el formato en que emite sus informes de laboratorio (electrónico o en papel). En cuanto al informe de laboratorio, debe incluir:

- Comentarios sobre la calidad de la muestra que pudieran comprometer los resultados del análisis, como es el caso de los índices séricos, que será tratado más adelante.
- Comentarios sobre la adecuación de la muestra respecto a los criterios de aceptación/rechazo establecidos. Este condicionante se debe tener en cuenta para la ampliación de pruebas que se

solicitan con mucha frecuencia después del análisis primario de la muestra.

- Resultados de criterio alarmante: valores críticos y de alerta.
- Comentarios interpretativos sobre los resultados.

En cuanto al formato que debe seguir el informe de laboratorio y a la información que debe incluir, cabe destacar:

- Identificación del laboratorio que emitió el informe.
- Identificación de los análisis que hayan sido realizados por un laboratorio subcontratista.
- Identificación y ubicación del paciente en cada página del informe.
- Identificación del solicitante y su información de contacto.
- Fecha de registro, además de la hora cuando sea pertinente.
- Fecha de informe de laboratorio y hora de comunicación.
- Tipo de muestra primaria.
- Número de página respecto al número total de páginas (por ejemplo: "página 1 de 4").
- Identificación de los facultativos que revisaron los resultados y autorizaron la comunicación del informe de laboratorio, así como un modo de contacto con dicha sección. En otros hospitales, como en el H. Universitario Marqués de Valdecilla (Santander) identifican, además de con el nombre, con su cargo a los profesionales que han validado el resultado (facultativo o residente).
- Identificación clara del análisis incluyendo, cuando corresponda, el procedimiento analítico.
- Resultados analíticos expresados en unidades del Sistema Internacional (SI), unidades con trazabilidad hasta unidades del SI u otras unidades aplicables.
- Intervalos de referencia biológicos, valores de decisión clínica o diagramas/nomogramas que sustenten dichos valores.
- Comentarios interpretativos de los resultados, cuando proceda.
- Comentarios acerca de pruebas ampliadas para completar el informe u obtener mayor rentabilidad diagnóstica o pronóstica a la muestra, como se

comentará más adelante en el apartado de índices séricos.

- Identificación de los análisis efectuados como parte de un programa de investigación o que se encuentra en desarrollo para los cuales todavía no existe disponible ninguna especificación acerca de la medición. Por ejemplo, en nuestro informe indicamos con un símbolo (^) las pruebas que no se encuentran amparadas por la acreditación ENAC.

INTERVALOS DE REFERENCIA Y TOLERANCIA

Para que los resultados cuantitativos de concentración de una magnitud bioquímica que emitimos en el informe adquieran significado deben ir acompañados de unos valores de referencia. Estos se obtienen a partir de una población de referencia biológica y deben ser establecidos por cada laboratorio. Por lo tanto, variarán en función de los criterios de inclusión y exclusión a la hora de seleccionar la población de referencia (factores biológicos (edad, sexo), preparación del individuo (dieta, ayuno, etc.), tipo de muestra (suero, plasma)) y de la técnica analítica empleada.

Una vez obtenidos los resultados analíticos de la población de referencia y eliminados los valores atípicos, se representa la distribución de frecuencias en un histograma (concentración del analito en eje de abscisas y frecuencia relativa en eje de ordenadas). Si la distribución es gaussiana, se define el intervalo de referencia como aquel que incluye el 95% central de los datos ($\bar{x} \pm 1,96$ DE). Si la distribución de frecuencias no corresponde a una distribución gaussiana, se define el intervalo de referencia como aquel comprendido entre los percentiles 2,5 y 97,5.

En ambos casos, se eliminan el 5% de los resultados (2,5% de los resultados más bajos y 2,5% de los resultados más altos) habiéndose obtenido en una población inicialmente sana. Por ello, resulta más correcto definir estos intervalos como intervalos de referencia y no de normalidad, ya que un resultado fuera de ese intervalo no implica enfermedad, aunque la probabilidad de que sea así aumenta conforme el valor obtenido se aleja del límite del intervalo. Además, el término "normalidad", desde el punto de vista estadístico, supone una distribución gaussiana que no siguen todas las magnitudes biológicas.

El establecimiento de intervalos de referencia está sujeto a numerosos factores que introducen variabilidad en el proceso. Un modo de aumentar la homogeneidad sería realizar dicho proceso en varios subgrupos, por ejemplo, en función del sexo, edad o situación clínica (gestación). Si la diferencia de medias calculada en dichos subgrupos para un determinado analito es superior al 25% del intervalo de referencia obtenido en el grupo no separado (sin separación por sexo, edad o gestación), sí sería conveniente emplear intervalos de referencia diferenciados para cada subgrupo. Por todo ello, es de vital importancia que en los informes de resultados se especifique el intervalo de referencia establecido en el propio laboratorio y, en caso de ser necesario, se haga la diferenciación adecuada en función de los factores biológicos no modificables (edad, sexo, raza). Además, estos intervalos diferenciados por grupos de

población nos permiten asegurar la coherencia de los resultados con la situación clínica y biológica del paciente.

Algunos de los parámetros cuyos intervalos de referencia tenemos especificados por grupos de edad son albúmina, bilirrubina, cloro o calcio. Mientras, para parámetros como ácido úrico, creatinina, fósforo, fosfatasa alcalina y ferritina tenemos especificados intervalos de referencia por grupos de edad y por sexo, tal como se establece en la siguiente tabla:

Edad	Albúmina
0 días – 4 días	2,8 – 4,4
4 días – 14 años	3,8 – 5,4
14 años – 18 años	3,2 – 4,5
> 18 años	3,5 – 5

Edad	Bilirrubina
0 días – 1 día	2 – 6
1 día – 2 días	6 – 7
2 días – 5 días	4 – 12
> 5 días	0,2 – 1

Sexo	Edad	Creatinina
	0 días – 30 días	0,24 – 0,85
	1 mes – 5 años	0,31 – 0,47
	5 años – 9 años	0,4 – 0,6
	9 años – 13 años	0,53 – 0,79
	13 años – 15 años	0,57 – 0,87
Masculino	> 15 años	0,7 – 1,2
Femenino		0,5 – 0,9

Sexo	Edad	Ácido úrico
	0 días – 1 mes	2,2 – 5,2
	1 mes – 12 meses	2,2 – 6,2
Masculino	> 1 año	2,2 – 7
Femenino		2,2 – 5,7

Tabla 1. Intervalos de referencia establecidos en el Laboratorio de Bioquímica y Análisis clínicos del Hospital Universitario 12 de Octubre para algunos parámetros bioquímicos a fecha de enero de 2023. Elaboración propia.

Unos intervalos más amplios y que incluyen los valores de referencia, son los intervalos de tolerancia. Los resultados incluidos en dichos intervalos de tolerancia se autovalidan en algunos conjuntos de pruebas definidos por los facultativos. Se conoce como validación automática o autovalidación al proceso por el cual los resultados del análisis del paciente se envían al SIL y se comparan con los criterios de aceptación definidos por el laboratorio, incluyéndose automáticamente en el informe sin ninguna intervención adicional. Se consigue así liberar de trabajo al personal facultativo, sobre todo en hospitales con elevada carga de trabajo asistencial.

VALOR DE REFERENCIA DEL CAMBIO: DELTA CHECK

Una de las alarmas que podemos encontrarnos al revisar los resultados previamente a su validación es la alarma *Delta-check*. En muchas ocasiones, el laboratorio realiza mediciones seriadas de un analito a lo largo del tiempo para, por ejemplo, ajustar el diagnóstico, monitorizar un tratamiento o hacer un seguimiento de una enfermedad

aguda o crónica. En dichos resultados vamos a encontrar una variabilidad total que será resultado de la variabilidad intraindividual (muy variable en función del parámetro analizado, y que se puede consultar en la base de datos de la EFLM (*European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*)), preanalítica (mínima si se logra estandarizar la preparación del paciente y la obtención y manejo de la muestra) y analítica (se obtiene del propio control de calidad interno).

$$CV_T^2 = CV_I^2 + CV_P^2 + CV_A^2$$

Sin tener en cuenta la variabilidad preanalítica para el cálculo de la variabilidad total, la fórmula anterior se puede simplificar de la siguiente manera:

$$CV_T = \sqrt{CV_I^2 + CV_A^2}$$

Para determinar si la diferencia entre dos resultados consecutivos obtenidos tras semanas o meses es significativa, se definió en concepto de diferencia crítica o valor de referencia del cambio (VRC): cambio en la concentración del analito requerido para que adquiera significado clínico. Es decir, define el porcentaje de cambio entre las dos determinaciones que es necesario para considerarlo clínicamente relevante. Mejorando la metodología y disminuyendo la variabilidad analítica, el porcentaje de cambio en la concentración del analito necesario para que sea significativo disminuye.

$$VRC = \sqrt{2} \cdot Z \cdot \sqrt{CV_I^2 + CV_A^2}$$

El VRC se emplea para el *Delta-checking* y el SIL puede adaptarse para cumplir esta función mostrándonos la siguiente alerta: TD. El VRC es una de las formas clásicas y más sencillas de calcular el *Delta-check*. Sin embargo, presenta ciertas limitaciones como asumir que la distribución de los datos es gaussiana y que el coeficiente de variabilidad analítica es constante a lo largo de todas las mediciones. Otras fórmulas más complejas para calcular el *Delta-check* son el VRC Fokkema, la fórmula de Harris o Jones GR. La alarma TD aparecerá cuando la diferencia entre dos mediciones del mismo analito separadas por un marco de tiempo previamente especificado sea superior al VRC, es decir, cuando ese cambio cuantitativo sea significativo.

Además de las utilidades ya nombradas, el *Delta-check* nos permite informar acerca de la integridad de la muestra al detectar cambios significativos en ciertos parámetros; localizar errores analíticos, en caso de que aparecieran alarmas TD en el mismo parámetro en sucesivas analíticas; y también detectar errores en la identificación de pacientes, ya que estaríamos obteniendo cambios significativos en uno o más parámetros.

En nuestro laboratorio tenemos establecidas alarmas *Delta-check* en parámetros como bilirrubina total, calcio, creatinina, amilasa y proteína C reactiva. Por ejemplo, en el caso de la bilirrubina, aparecerá una alarma *Delta-check* que impide que el resultado se autovalide aunque se encuentre dentro del intervalo de referencia establecido si se cumplen las

siguientes condiciones: el valor actual se encuentra entre 0 y 1 mg/dl, la fecha del resultado previo es de los últimos 7 días y el resultado actual ha disminuido en 3 unidades respecto al resultado previo.

VALORES CRÍTICOS: ESTABLECIMIENTO Y COMUNICACIÓN

Antes de profundizar en cómo se establecen los valores críticos y los protocolos empleados para su comunicación, debemos diferenciar entre valores de alerta y valores críticos. Los valores de alerta o alarma son resultados que, comunicados rápidamente, pueden suponer un beneficio en la salud del paciente, pero que no informan de una situación clínica urgente. Los valores críticos o de pánico, que definió Lundberg en el año 1972, son aquellos resultados tan alejados de los valores de referencia que pueden poner en peligro la vida del paciente a menos que se inicie rápidamente un tratamiento apropiado.

La comunicación rápida de estos resultados disminuye la morbimortalidad de los pacientes y el coste sanitario. La norma ISO 15189:2013 (apartado 5.8, subapartado 5.8.7) recoge que el laboratorio debe tener procedimientos para avisar inmediatamente cuando los resultados de los análisis se encuentren dentro de los intervalos de alarma establecidos. Exige la comunicación rápida y segura de los valores críticos y el registro de dicha comunicación (emisor y receptor de la información, vía empleada y si el interlocutor ha comprendido la información) con el objetivo de que quede trazabilidad del proceso. La comunicación se suele hacer por llamada telefónica, informando de los datos del paciente y el valor analítico obtenido y debe incluir la repetición del resultado por parte del receptor. Esto último se conoce como *Read-back* y consiste en pedir al receptor de la llamada que repita el nombre, número de historia y valor crítico informado de dicho paciente, pudiendo reducir errores de comprensión fruto de la comunicación oral.

Cada laboratorio debe definir sus propios valores críticos (qué pruebas y a partir de qué valores) y el protocolo de comunicación de los mismos. Para elaborar este listado debemos tener en cuenta las características de la población a la que atiende el hospital, las enfermedades más prevalentes y su fisiopatología y las especialidades existentes en el centro, además de valorar si es necesaria la elaboración de diferentes listados para pacientes extrahospitalarios, hospitalizados, de urgencias y pediátricos, estando dichas decisiones basadas en criterios clínicos. En nuestro caso, informamos los siguientes valores críticos en las peticiones de urgencias:

pH	< 7,1	> 7,6
Glucosa	< 45	> 400
Sodio	< 120	> 160
Potasio	< 2,8	> 6,5

Tabla 2. Valores críticos establecidos en el Laboratorio de Bioquímica y Análisis clínicos del Hospital Universitario 12 de Octubre para peticiones de urgencias a fecha de enero de 2023. Elaboración propia.

La correcta comunicación de valores críticos a los clínicos es un importante indicador de calidad en el laboratorio ya que contribuye significativamente a la efectividad clínica, seguridad del paciente y eficiencia del trabajo, pero además también permite coordinar las labores de los profesionales sanitarios de laboratorio y de aquellos que están directamente en contacto con el paciente en torno al mismo, dando un valor muy relevante al laboratorio en el papel asistencial del cuidado al paciente.

Para cumplir con esta garantía de calidad es necesario que dichos valores sean reconocidos de forma rápida y fácil, y para ello se dispone de sistemas de aviso dentro del SIL. En nuestro caso, en las analíticas pedidas de forma urgente se crean de forma automática 2 pruebas adicionales llamadas “Valor crítico -- informado por” y “Valor crítico -- recepcionado por”.

Cuando observamos que ya existe registro de su comunicación en días anteriores, algo que ocurre sobre todo en pacientes hospitalizados, puede no ser necesario volver a informar el mismo. En estos casos, en nuestro laboratorio registramos el comentario NAH (“No avisado. Resultado habitual en el paciente”). Volver a informar un mismo valor crítico en sucesivos días puede suponer retrasos en otras tareas o al informar valores críticos repentinos de otros pacientes, además de suponer molestias innecesarias que interrumpen las tareas de los clínicos. Sin embargo, algunos autores consideran que volver a comunicar dicho valor crítico indica mayor implicación y grado de vigilancia por parte del laboratorio.

En otras ocasiones, resulta imposible contactar con el servicio peticionario, y tan solo podemos, desde el laboratorio, validar el resultado y añadir como comentario que ha sido imposible comunicar de forma oral el valor crítico obtenido (ICT: “Imposible Comunicación Telefónica”).

En peticiones de pacientes ambulatorios, hospitalizados, solicitadas por los Centros de Especialidades a través de HCIS o desde consultas de rutina, salta una “Alerta clínica HCE” en la que rellenamos “SI” o “NO” con el objetivo de que, una vez comprobado, ese valor crítico se vuelque o no a una vista de alarmas clínicas en la sesión del médico peticionario en HCIS.

Si se trata de peticiones realizadas desde Atención Primaria, se abren 5 campos que deben ser rellenados además de realizar la llamada comunicando dicho valor crítico (facultativo informante, fecha y hora, médico que ha recepcionado la llamada y si se ha producido *Read-Back*). Se ha planteado establecer un nuevo circuito para la comunicación de valores críticos en Atención Primaria mediante el BUZGEN (correo electrónico al buzón genérico).

Esta comunicación sería similar a lo que se ha implementado recientemente para informar variantes patogénicas o probablemente patogénicas en genes de susceptibilidad a cáncer hereditario. En estos casos, si el servicio peticionario forma parte del hospital, recibirá una notificación en la página de inicio de Intranet que direcciona al resultado en HCIS. En caso de tratarse de hospitales periféricos al Hospital Universitario 12 de Octubre, se envía un correo electrónico para avisar de que ya pueden consultar el resultado a través del visor de resultados externo ATOM (*Landra*). En este

correo hay un enlace para la confirmación de lectura del mismo, de forma que, en caso de no confirmarse, se volvería a enviar otro correo automáticamente hasta asegurar su lectura. Permite un mejor manejo de la información pudiendo adelantar la cita al paciente si fuera necesario.

Es importante comunicar dicho valor con rapidez, pero también verificar si ese resultado es real. Una de nuestras labores dentro de la fase postanalítica es comprobar si un valor analítico anormal, tanto si se trata de un valor crítico como si no, es resultado de interferencias analíticas (índices elevados de hemólisis, ictericia o lipemia), contaminación con constituyentes de otros tubos (presencia de EDTA en tubo de heparina de litio o de gel separador), interferencias debidas a la toma de fármacos, a un procedimiento de extracción de sangre incorrecto que hace que la muestra contenga fluidos parenterales que esté recibiendo el paciente como suero glucosado o suero salino.

Resulta de vital importancia valorar estas posibilidades antes de informar un valor crítico como tal y, en caso de sospecha, comunicarla al servicio peticionario y recomendar la repetición de la extracción. Por otro lado, un resultado anormalmente bajo puede hacernos sospechar de un error analítico de pipeteo por bajo volumen de muestra o por error en la aspiración, y en este caso existe la posibilidad de repetir la determinación antes de su comunicación.

ÍNDICES SÉRICOS: hemólisis, lipemia e ictericia

Los índices séricos son un dato semicuantitativo del grado de hemólisis, ictericia y lipemia de la muestra que se obtiene a través de la medición de la absorbancia a diferentes longitudes de onda. Los índices de hemólisis e ictericia se corresponden con la concentración de hemoglobina y bilirrubina, respectivamente. El índice de lipemia se correlaciona con la turbidez de la muestra y hace referencia a la presencia de elevadas cantidades de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Son indicadores de la calidad de la muestra y útiles en la determinación de ciertos parámetros que se ven afectados por dichas interferencias.

Centrándonos en la fase postanalítica y el informe, en nuestro laboratorio disponemos de comentarios codificados para informar de la posible interferencia (RIH, RIL: “Riesgo de interferencia por hemólisis/lipemia”) y la anulación de ciertos parámetros en función de los resultados de los índices séricos. Esto se realiza de forma totalmente automatizada en base a una “tabla de interferencias”, donde indicamos los puntos de corte de índices séricos que aplican la adición de un comentario o la eliminación del resultado a las más de 90 pruebas que conforman la bioquímica automatizada y de urgencias.

Un índice de hemólisis elevado puede ser debido a una hemólisis *in vivo* (3% de las muestras, debido a patologías como anemias hemolíticas) o *in vitro*, consecuencia de una extracción o procesamiento preanalítico de la muestra incorrecto, que es lo más habitual. Sin embargo, los índices de ictericia y lipemia están asociados a la clínica y a las características del paciente. Por eso, para completar el informe y obtener mayor rentabilidad diagnóstica a la muestra, cuando los índices de lipemia e ictericia son elevados, se amplían pruebas de manera automática. El

objetivo de dichas ampliaciones es detectar hiperbilirrubinemias e hipertrigliceridemias ocultas: colesterol y triglicéridos en caso de obtener un índice de lipemia elevado, y bilirrubina total en caso de índice de ictericia elevado. Tenemos establecidas las siguientes normas:

- Si la prueba “índice de ictericia” tiene un resultado ≥ 5 , el paciente tiene más de 1 mes de vida (para evitar consumir volumen de muestras que suelen ser escasas o insuficientes), si no tiene ya solicitada la determinación de bilirrubina y además no hay un índice de ictericia > 5 en los últimos 7 días, se amplía la prueba “Bilirrubina” y “Ampliación Ictericia”, junto con el comentario “Parámetro ampliado desde el laboratorio debido al color de la muestra”.
- Si la prueba “índice de lipemia” tiene un resultado ≥ 100 , el paciente tiene más de 1 mes de vida (para evitar consumir volumen de muestras que suelen ser escasas o insuficientes), si no tiene ya solicitada la determinación de triglicéridos y además no hay un índice de lipemia > 100 en los últimos 7 días, se amplía la prueba “Colesterol”, “Triglicéridos” y “Ampliación Lipemia”, junto con el comentario “Parámetro ampliado desde el laboratorio debido a la turbidez de la muestra”.

Hasta hace no mucho tiempo, los valores numéricos obtenidos en los índices séricos sí aparecían en nuestros informes de resultados. Sin embargo, se decidió no mostrarlos como tal, aunque sí implementar los comentarios automáticos ya mencionados anteriormente a ciertas determinaciones (RIH, RIL).

En la mayoría de los hospitales españoles, los índices no se muestran en el informe de laboratorio aunque sí se validan y se tienen en cuenta para anular o añadir un comentario de “posible interferencia” (Ver Tabla 3). En algunos, como en el Hospital Universitario de Navarra o en el Hospital Universitario Puerta del Mar, se muestran los resultados obtenidos en los tres índices séricos, mientras que en el Hospital General Universitario de Alicante solo se muestra el índice de hemólisis (datos obtenidos mediante una encuesta a profesionales de estos laboratorios a fecha de enero de 2023).

Hospital	Índice de hemólisis	Índice de lipemia	Índice de ictericia
H.G.U. de Alicante (Alicante)	✓	✗	✗
H.U. de Bellvitge (Barcelona)	✗	✗	✗
H.U. Mútua Terrassa (Barcelona)	✗	✗	✗
H.U. Vall d'Hebron (Barcelona)	✗	✗	✗
H.U. Puerta del Mar (Cádiz)	✓	✓	✓
H.U. de Gerona (Gerona)	✗	✗	✗
H.R.U. de Málaga (Málaga)	✗	✗	✗

H.U. 12 de Octubre (Madrid)	✗	✗	✗
H.U. La Paz (Madrid)	✗	✗	✗
H.U. Fundación Alcorcón (Madrid)	✗	✗	✗
H.U. Gregorio Marañón (Madrid)	✗	✗	✗
H.C.U. Virgen de la Arrixaca (Murcia)	✗	✗	✗
C.U. de Navarra (Navarra)	✗	✗	✗
H.U. de Navarra (Navarra)	✓	✓	✓
H.U. Marqués de Valdecilla (Santander)	✗	✗	✗
H.U. de la Ribera (Valencia)	✗	✗	✗

Tabla 3. Índices séricos visibles en el informe de laboratorio según diferentes hospitales españoles a fecha de enero de 2023. Elaboración propia.

ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS Y AMPLIACIÓN DE PRUEBAS

En el apartado anterior se han nombrado ejemplos de pruebas que se amplían automáticamente cuando los índices de lipemia o ictericia son elevados. Sin embargo, es muy común la ampliación manual de pruebas en peticiones recientes solicitada por los clínicos posteriormente a la realización de la petición inicial, ya sea para guiar, confirmar o descartar un diagnóstico o para verificar la eficacia de un tratamiento.

Tenemos establecidos tres niveles de decisión en función de qué pruebas pueden ampliar los diferentes profesionales sanitarios (nivel técnico, nivel facultativo de guardias o sección de preanalítica y nivel facultativo de áreas especializadas) y 2 niveles de prioridad (urgente y normal). Antes de realizar una ampliación, es importante tener en cuenta ciertos aspectos: el tipo de tubo del que se dispone en la petición original, si hay volumen suficiente para esa nueva determinación, si el modo de conservación de la muestra permite ese análisis y si el tiempo transcurrido desde la toma de la muestra no supera la estabilidad óptima.

El personal encargado de hacer ampliaciones debe disponer para su consulta de un listado de pruebas en el que poder verificar que el tiempo de estabilidad de las muestras no supera el máximo recomendado para la determinación de los parámetros solicitados para ampliar y que se dispone del tipo de tubo necesario para dichas determinaciones. En caso de superar el tiempo de estabilidad recomendado, lo más adecuado sería realizar una nueva petición, aunque se podría valorar analizar algunos parámetros añadiendo en el informe un comentario que alerte de que las condiciones del análisis no han sido las óptimas. Esta decisión debería tomarse en base al tiempo transcurrido, la situación clínica del paciente y la dificultad de realizar una nueva extracción.

BIOBANCOS

El curso habitual de una muestra después de haber analizado todos los parámetros solicitados es ser almacenada y posteriormente desechada como residuo biológico. Sin embargo, no todas las muestras siguen el mismo camino, y por ello este último apartado está dedicado a los biobancos.

Un biobanco es un establecimiento que recoge muestras biológicas asociadas a información clínica que son obtenidas, procesadas, almacenadas y gestionadas, sin ánimo de lucro, para ponerlas al servicio de la sociedad con el objetivo de promover la investigación biomédica. Por lo tanto, no es únicamente un depósito de muestras, sino que pretende recolectar muestras de calidad para ponerlas a disposición de la comunidad científica.

Las tres principales normas que rigen el funcionamiento de los biobancos son las siguientes: Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD), que otorga el máximo nivel de protección a los datos de salud; Ley 14/2007 de Investigación Biomédica (LIB), que reguló por primera vez la figura de los biobancos y donde se define que la muestra deja de ser una mera porción biológica del paciente/donante para considerarse un continente de información de carácter personal; y el Real Decreto 1716/2011, por el cual se establecen los requisitos necesarios para la autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y para el tratamiento de muestras biológicas de origen humano, además de regular el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica.

Para su funcionamiento, un biobanco debe ser autorizado por la autoridad autonómica competente (Consejería de Salud) y posteriormente registrado en el Registro Nacional de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III. Por lo tanto, un biobanco se puede definir dentro de 4 dimensiones: técnica, que garantiza un compromiso de calidad y eficiencia; científica, que promueve que los biobancos deban evolucionar y adaptarse a los nuevos requerimientos de la investigación científica; ético-legal, cumpliendo estrictamente las normativas que garantizan su buen funcionamiento; y social, ya que es la sociedad la que, en último término, se beneficia de los avances en biomedicina.

Tipos de colecciones:

- Colecciones privadas. Hay un único titular que procesa e investiga con las muestras, sin posibilidad de cesión de muestras o datos a terceros.
- Colecciones de proyecto. Se trata de muestras destinadas a un proyecto de investigación concreto, no pudiendo emplearse para otros proyectos ni cederse a terceros sin un nuevo consentimiento informado firmado por el donante.
- Colecciones de línea de investigación. Son similares a las colecciones de proyecto, pero en un concepto más amplio. Se trata de muestras que pueden ser destinadas a diversos proyectos de una temática común, claramente recogida en el

consentimiento informado, pudiendo ser cedidas a terceros especificando su identidad en el mismo y siempre y cuando se siga la misma línea de investigación.

- Biobancos. Es el concepto más amplio, y así se recoge en el consentimiento informado. Se trata de una colección de muestras destinadas a favorecer la investigación biomédica, teniendo que superar la supervisión de un Comité de Ética y un Comité Científico externos al biobanco.

Por otro lado, podemos distinguir tres estructuras organizativas:

- Biobanco, como institución única con única sede y titular. Es la forma más habitual de biobanco.
- Biobanco en red. Institución única con un único titular pero con una estructura descentralizada, trabajando en sedes físicamente separadas con un responsable por centro aunque bajo la misma dirección.
- Red de biobancos. Se trata de biobancos como instituciones independientes que coordinan sus acciones y toman decisiones de forma conjunta.

CONCLUSIÓN

La importancia de la fase postanalítica en el proceso global de laboratorio radica en su objetivo final: la obtención, revisión, validación y emisión de resultados. Uno de los aspectos más importantes de esta etapa es la elaboración del informe de laboratorio, que cumple requisitos acerca de la información que debe estar recogida en el mismo. Antes de emitir unos resultados como definitivos, estos deben ser revisados por el personal facultativo teniendo en cuenta las posibles interferencias, alarmas programadas en el SIL y comunicando valores críticos como se encuentra establecido en los protocolos. El paso final de esta fase, como cabe esperar, es el almacenamiento, custodia, posible ampliación de pruebas y posterior desecho de la muestra. Sin embargo, las muestras biológicas también pueden formar parte de biobancos y así seguir colaborando con la sociedad en la generación de nuevos avances biomédicos.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. González Hernández, Á. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 3ª ed. Barcelona: Elsevier; 2019.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- AENOR. Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia (ISO 15189:2012). 2013.
- Comisión de residentes de AEFA. Manual de supervivencia para primero de residencia. 1ª ed. Asociación Española del Laboratorio Clínico; 2021.

- Fraser, C.G. Reference change values. Clinical chemistry and laboratory medicine. 2012; 50(5):807-812.
- Gallart Millán, L. Biobancos y gestión de muestras biológicas en investigación. Ed. Cont. Lab. Clin. 2017; 33:12-23.
- González Hernández, Á. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 3ª ed. Barcelona: Elsevier; 2019.
- López Pelayo, I. La comunicación de valores críticos como herramienta de seguridad para el paciente. En: Programa de Formación Continuada a Distancia. Asociación Española de Farmacéuticos analistas; 2013.

REMODELADO ÓSEO: APLICACIÓN DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS

Autor: Maialen Palomino Alonso, Ilenia Liria González.

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

Palabras clave: remodelado óseo, marcadores bioquímicos, P1NP.

INTRODUCCIÓN

El hueso es un órgano vivo que va sufriendo transformaciones constantes a lo largo de la vida, lo que lo convierte en un tejido dinámico. Se caracteriza por presentar gran rigidez, dureza y capacidad de reparación y regeneración. Es un órgano altamente especializado compuesto por una matriz orgánica mineralizada donde que se incluyen diferentes tipos de células.

El mayor constituyente del mineral óseo es la hidroxiapatita, localizada en forma de cristales dentro y entre las fibrillas de colágeno que forman la matriz orgánica. También hay otros minerales en menor proporción: calcio, fósforo, sodio, magnesio. El colágeno tipo I constituye aproximadamente el 98% de la matriz orgánica y el 2% restante son proteínas no colagénicas, entre las que se encuentran proteoglicanos, glicoproteínas, osteocalcina y osteonectina. Las fibras colágenas proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión. Además, en el hueso también se incluyen células especializadas en el remodelado y el soporte: osteoblastos, osteoclastos y osteocitos.

En los últimos años cada vez está cobrando mayor interés el estudio del metabolismo óseo, debido a la alta incidencia de la osteoporosis junto con una de las complicaciones más importantes que conlleva que son las fracturas.

El estudio de determinados marcadores bioquímicos ha permitido un mayor conocimiento para su aplicación en la práctica clínica. Son de utilidad en la valoración del recambio óseo o en la monitorización de los tratamientos. También hay otros estudios que determinan su aplicabilidad en la predicción de la tasa de pérdida ósea, en la predicción del riesgo de fractura o incluso en la detección precoz de la patología metastásica.

REMODELADO ÓSEO

El hueso es una estructura metabólicamente activa que se encuentra sometida a un proceso continuo de formación y resorción que es lo que se conoce como remodelado óseo. Este proceso tiene lugar de forma sincronizada en las denominadas unidades de remodelado. Es un proceso que se produce durante toda la vida del individuo y que está regulado por factores mecánicos, genéticos y hormonales. El recambio óseo es el volumen total del hueso que es renovado por unidad de tiempo mediante el proceso de remodelado óseo, siendo un 20% del esqueleto reemplazado por este proceso cada año.

El remodelado óseo tiene como objetivo reemplazar el tejido óseo envejecido por tejido nuevo, manteniendo la integridad del esqueleto o el balance óseo. Si los procesos de formación y resorción están completamente coordinados el balance es cero o neutro y la masa ósea total no variará. Por el contrario, si la formación y la resorción no son iguales el balance óseo no será neutro y la masa ósea se modificará en sentido positivo (formación) o negativo (destrucción).

El ciclo del remodelado óseo sigue la siguiente secuencia de cinco fases, que en total dura unos cuatro o cinco meses, aunque es necesario algo más de tiempo hasta que se alcanza la madurez completa (Figura 1).

1. **Reposo o quiescencia.** Parte de un estado en el que la superficie ósea se encuentra inactiva, cubierta por una capa de células de revestimiento. Por debajo de la capa celular está la membrana endóstica, compuesta por tejido conectivo no mineralizado.
2. **Activación.** Comienza la digestión de la membrana endóstica a partir de la acción de la colagenasa segregada por las células de revestimiento. Posteriormente estas células se retraen, con lo que la superficie mineralizada queda expuesta. Esto atrae a un grupo de células, que se diferencian en osteoclastos y proliferan.
3. **Resorción:** los osteoclastos reabsorben el hueso en dos fases, por un lado, disuelven el mineral tras producir un microambiente ácido bajo su superficie y, por otro lado, degradan la matriz de colágeno mediante liberación de enzimas (metaloproteinasas y catepsinas K, B y L). Se genera la denominada bahía o laguna de resorción. Cuando se completa el proceso, los osteoclastos mueren por apoptosis. Este proceso transcurre en unas 4-6 semanas.
4. **Fase de inversión o reversa:** en la bahía de resorción se forma una línea de cemento donde se depositan células mononucleares (fagocitos) y proosteoblastos, atraídos por factores de crecimiento.
5. **Fase de formación:** Los osteoblastos acoplados en la línea de cemento sintetizan de forma gradual la nueva matriz orgánica colagénica, que se denomina osteoide. A los pocos días comienza a mineralizarse la matriz mediante la precipitación de fosfato cálcico, que luego cristaliza en forma de hidroxiapatita. Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en osteocitos. La fase de formación puede durar de 3 a 5 meses.

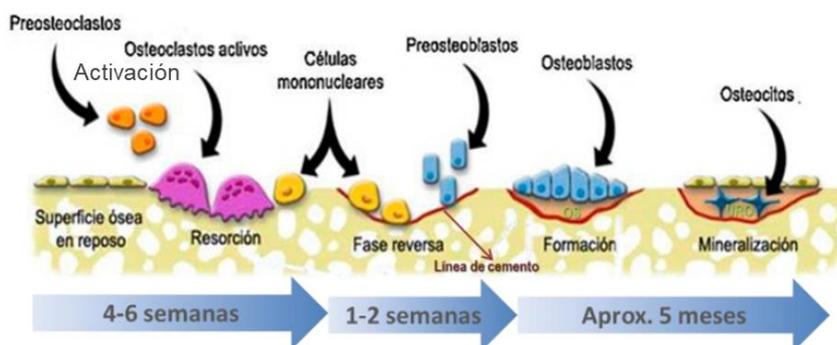


Figura 1. Fases del remodelado óseo. Adaptado de Bueno Vargas MP, 2017.

6. Fase de reposo o quiescencia: en la última etapa, la superficie ósea se vuelve a cubrir por una delgada capa de hueso no mineralizado y de células de revestimiento.

El remodelado permite que el hueso responda a medio y largo plazo a los cambios de las necesidades mecánicas y metabólicas del organismo. Tiene un papel tanto en la reparación del tejido óseo, como en la regulación del metabolismo fosfo-cálcico, además actúa como sistema tampón para mantener el equilibrio ácido-base y es capaz de absorber toxinas y metales pesados, minimizando sus efectos adversos en otros tejidos.

Como se ha comentado anteriormente, los procesos de formación y resorción están estrechamente acoplados, siendo en condiciones normales el balance cero. El impacto sobre el hueso está determinado por el índice de remodelado óseo, que depende del número total de unidades de remodelado activo (aproximadamente 1 millón) y por el balance del remodelado, que a su vez depende de la cantidad relativa de hueso formado y reabsorbido en cada unidad. Un desequilibrio en este balance puede ocurrir por un aumento de la resorción ósea, lo cual es más dañino al haber perforación de las trabéculas y su pérdida, o puede deberse a una disminución de la formación ósea derivada del adelgazamiento trabecular.

PATOLOGÍA RELACIONADA CON EL METABOLISMO ÓSEO

El término de enfermedad metabólica ósea fue introducido en 1984 por Albright y Reifenshtein, para hacer referencia a aquellas enfermedades del esqueleto asociadas a factores principalmente metabólicos.

Incluye entre otros procesos, los relacionados con alteraciones tanto de la mineralización ósea como del remodelado óseo. El resultado final es una alteración de la microarquitectura ósea viéndose afectada la resistencia del tejido óseo.

Entre las alteraciones de la mineralización ósea se encuentran enfermedades como osteomalacia, raquitismo y osteogénesis imperfecta.

Dentro de las alteraciones del remodelado óseo, la más frecuente es la osteoporosis. Otras patologías menos frecuentes incluyen la enfermedad ósea de Paget, que cursa con un marcado aumento del remodelado óseo en zonas

localizadas, y también diversas enfermedades endocrinas con afección ósea: hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo o enfermedad de Cushing.

- **Osteoporosis:**

La osteoporosis es el trastorno óseo metabólico más común, caracterizado por el deterioro estructural del tejido óseo, que conlleva un alto riesgo de fractura. En España la padecen 3 millones de personas, predominantemente mujeres. Afecta aproximadamente a un 30% de mujeres después de la menopausia, a 1 de cada 8 hombres mayores de 50 años y a la mayoría de las personas ancianas independientemente del sexo. Está previsto que incremente el número de casos con el aumento de la esperanza de vida.

Fisiológicamente se produce un pico de masa ósea alrededor de los 30 años, y a partir de ahí se va generando una pérdida progresiva. Por tanto, la osteoporosis se desarrolla con la edad y que puede aumentar considerablemente tras la presencia de la menopausia (osteoporosis primaria). El déficit estrogénico en la menopausia, resulta en un incremento generalizado de las unidades de remodelado óseo y en un desequilibrio entre formación y resorción. Esto lleva a una disminución de la masa ósea que va acompañada de cambios perjudiciales e irreversibles en la microarquitectura trabecular y cortical del hueso. Además, la osteoporosis puede estar relacionada con distintas enfermedades y tratamientos (osteoporosis secundaria) e influenciada por factores ambientales o genéticos.

La osteoporosis se trata de una enfermedad crónica y progresiva, silenciosa durante un periodo de tiempo, pero puede hacerse visible como una fractura, cuando ya la enfermedad puede estar muy avanzada. Las fracturas más comunes son las de cadera, columna vertebral, antebrazo distal y húmero proximal. Esto conlleva un aumento de la morbilidad y una mortalidad 4 veces mayor en la tercera edad.

Hay descritos factores de riesgo que contribuyen significativamente a la fractura ósea, como son la edad, sexo, bajo índice de masa corporal, una fractura previa, o antecedentes familiares de fractura de cadera. Entre los factores ambientales que pueden influir encontramos el tratamiento con glucocorticoides, el tabaquismo o el consumo alcohol. Entre las enfermedades relacionadas con la osteoporosis encontramos la *diabetes tipo 1*, la osteogénesis imperfecta, el hipertiroidismo no tratado, los

hipogonadismos, la menopausia precoz, la malnutrición o malabsorción crónica o las hepatopatías).

La definición diagnóstica de osteoporosis de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se establece a partir del estudio de la densitometría mineral ósea (DMO) utilizando absorciometría dual de rayos X (DEXA) en el cuello del fémur o la columna vertebral. El denominado "T-score" es el que define el diagnóstico, siendo el número de desviaciones estándar en relación a la media de referencia. La media de referencia serían las mujeres adultas jóvenes, de entre 20 y 29 años, aplicándose los mismos valores absolutos en hombres. Así la osteoporosis queda definida como un valor 2,5 desviaciones estándar o más por debajo de la media de referencia

Una vez diagnosticado, el tratamiento aplicado debe ajustarse a las necesidades médicas y al estilo de vida de cada paciente. Los tratamientos disponibles se dividen en:

- Antiresortivos o anticatabólicos:
 1. Bisfosfonatos orales (alendronato, risedronato, ibandronato) se utilizan como tratamientos iniciales en la mayoría de los casos. Se deben revisar después de 3-5 años.
 2. Bisfosfonatos intravenosos (ácido zolenótrico) o denosumab en mujeres intolerantes a los orales o en aquellas en las que estén contraindicados.
 3. Raloxifeno o terapia hormonal sustitutiva como otras alternativas.
- Anabólicos:
 1. Análogos de la hormona paratiroidea (PTH).
 2. Teriparatida, que es preferentemente recomendada en pacientes con alto riesgo de fractura.

MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO

Históricamente el estudio de la masa ósea y del remodelado óseo se realizaba mediante análisis histomorfométrico en biopsias óseas de hueso no descalcificado, pero al ser una técnica invasiva, compleja y que no permitía un análisis seriado se dejó de realizar. Otra técnica para el análisis del remodelado de forma directa es el estudio de la cinética cálcica, pero es una técnica compleja, con variabilidad entre los modelos utilizados y no disponibles para hacer determinaciones seriadas.

En la última década se han desarrollado varios métodos para el diagnóstico y seguimiento de la osteoporosis, con técnicas que determinan el contenido mineral del hueso. Es lo que se denomina estudio de la DMO y la mayoría incluye métodos radiológicos:

- DEXA: es el *gold standard* en el diagnóstico de osteoporosis.
- Tomografía computarizada cuantitativa.

La cuantificación de la masa ósea permite determinar la densidad mineral ósea. Esta determinación presenta una serie de limitaciones: 1) no indica la actividad del tejido óseo por lo que no predice cuál será la evolución de la masa ósea, 2) presenta errores de precisión en determinaciones

realizadas en períodos inferiores a un año, 3) los datos obtenidos a partir de diferentes técnicas son variables lo que no permite su comparación y 4) tiene un elevado coste y no está disponible en todos los centros.

Estas limitaciones han conducido al desarrollo de otras técnicas que permiten valorar de forma indirecta el metabolismo óseo a través del uso de marcadores bioquímicos del remodelado óseo en líquidos biológicos.

Los marcadores bioquímicos son enzimas u otras proteínas secretadas por los osteoblastos y osteoclastos o bien sustancias producidas durante la formación o degradación del colágeno tipo I. Estos marcadores reflejan la actividad metabólica del tejido óseo en un momento concreto debido a que son liberadas al torrente sanguíneo durante los procesos de formación o resorción. Pueden ser determinadas en sangre u orina y son útiles en la evaluación de los trastornos metabólicos óseos.

Se pueden clasificar en aquellos que miden la actividad osteoblástica, que se denominan de formación, o los que derivan del número o actividad de los osteoclastos, que se definen como de resorción:

	Marcadores de formación	Marcadores de resorción
Suero	Fosfatasa alcalina total (FA) Fosfatasa alcalina ósea (FAO) Osteocalcina Péptido C-terminal del procolágeno tipo I (P1CP) Péptido N-terminal del procolágeno tipo I (P1NP)	Fosfatasa ácida-tárrato resistente (TRAP) Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (ICTP) β-CrossLaps Telopéptido N-Terminal del colágeno tipo I (NTX) Sialoproteína Catepsina K RANKL Osteoprogesterina Dickkopf-related protein 1 Esclerostina
Orina		Excreción urinaria de calcio Hidroxiprolina Piridinolina Deoxipiridinolina Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (ICTP) α -CrossLaps Telopéptido N-Terminal del colágeno tipo I (NTX)

Tabla 1. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo de formación y resorción medibles en suero y orina. Adaptado de Romero Barco CM, 2012.

Desde un punto de vista teórico, el marcador ideal sería aquel que reuniera las siguientes características:

- Específico del tejido óseo.
- No se modifique tras su paso por la circulación.
- Refleje específicamente los procesos de formación y resorción ósea por separado y permita diferenciar cada una de las fases del remodelado.
- Discrimine sujetos sanos de los que tienen alteraciones del metabolismo óseo.

Sin embargo, pese a que el marcador ideal no existe las ventajas que presenta su utilización son:

- Facilidad en la obtención de la muestra, siendo los especímenes de elección la sangre o la orina.
- Posibilidad de un control seriado y breve en el tiempo.
- Determinación de la actividad metabólica del hueso, permiten medir la actividad funcional, frente a la medida estática de la DMO.
- Observación de los cambios tras tratamiento de forma rápida.
- Son técnicas no muy caras.

A su vez presentan bastantes limitaciones:

- No son totalmente específicos.
 - Presentan variaciones analíticas y preanalíticas, derivando en una baja aplicación en la práctica clínica

La importancia de los marcadores radica en que podrían complementar a la densitometría en el manejo de la osteoporosis o de otras enfermedades con afectación ósea.

A continuación se van a detallar los marcadores que se determinan en nuestro hospital, relacionados con:

- Actividad celular de osteoblastos y osteoclastos (fosfatasa alcalina ósea).
- Otras proteínas no colagénicas (Osteocalcina).
- Colágeno tipo I (β -CrossLaps, P1NP).
 - **Fosfatasa alcalina ósea (FAO):**

La FAO es una isoenzima que corresponde al 40% de la fosfatasa alcalina total.

Es una glicoproteína tetramérica que se localiza en la membrana celular del osteoblasto, siendo un indicador de la actividad metabólica de estas células. Circula en suero como un dímero soluble de alto peso molecular (86000 Da). La función de la enzima es liberar fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, lo que es necesario para la mineralización, por lo que su déficit se asocia con una alteración de la mineralización ósea.

La determinación de esta enzima se utiliza en:

- Estudio del remodelado óseo en osteoporosis y vigilancia de la respuesta al tratamiento antirresortivo en estos pacientes.
- Marcador de elección para estudio del remodelado óseo en pacientes con insuficiencia renal, ya que no se elimina por el riñón debido a su elevado peso molecular.

- Valoración de la actividad metabólica ósea en las formas monostóticas de la enfermedad de Paget (afectación de un solo hueso), osteomalacia, raquitismo, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo y osteodistrofia renal.
- Patología tumoral. Un aumento de su concentración se correlaciona con metástasis osteoblásticas. Es útil para el diagnóstico y seguimiento de metástasis óseas en cáncer de próstata. Valores significativos de metástasis son >30 ng/mL. Por encima de este valor, la correlación con gammagrafías óseas positivas es superior al 90%.¹

Aunque presenta baja sensibilidad y especificidad es un marcador útil en el estudio de la enfermedad metabólica ósea debido a que no presenta variación entre sexos, ni está influida por el ritmo circadiano.

- **Osteocalcina (OC):**

Proteína no colágena más abundante de la matriz extracelular, es específica del hueso y de la dentina. Su función es la de fijadora del calcio.

Es sintetizada por el osteoblasto como proosteocalcina, estimulada por la vitamina D3. Posteriormente esta molécula precursora se carboxila con ácido glutámico, para lo que es esencial la presencia de vitamina K. De este modo la osteocalcina presenta tres grupos de ácido gammacarboxiglutámicos, que son necesarios para su incorporación a la matriz ósea ya que es la región proteica donde se une al calcio.

La concentración sérica está relacionada con la tasa de recambio óseo, debido a que una vez liberada de los osteoblastos se incorpora a la matriz ósea y se secreta al flujo sanguíneo. En sangre se encuentra tanto el fragmento intacto más inestable, conocido como osteocalcina intacta (aminoácidos 1-49), como el fragmento resultante denominado N-MID (aminoácidos 1-43) mucho más estable.

Su medición se utiliza para el seguimiento de tratamientos con agentes antirresortivos (bifosfonatos u hormonoterapia sustitutiva) principalmente en pacientes con osteoporosis, pero también en enfermedades como el hiperparatiroidismo primario y secundario.

La osteocalcina sérica presenta ritmo circadiano, con un pico a las 4 a.m. y un valle a las 5 p.m. Tiene una vida media corta de unos 5 minutos, y es aclarada rápidamente por los riñones. En los pacientes con insuficiencia renal, los valores de osteocalcina pueden ser elevados tanto directamente, debido a trastornos en el aclaramiento como indirectamente, debido a una osteodistrofia renal. También depende de la influencia de la vitamina K.

- **β -CrossLaps (β -CTx):**

Son los denominados fragmentos telopéptidos isomerizados β C (carboxi)-terminales reticulados (β -CTx) producidos por los osteoclastos al hidrolizar el colágeno tipo I, mediado por la actividad de la enzima cathepsina K.

Un elevado porcentaje (70%) de las moléculas de colágeno de tipo I se encuentran en la forma isomerizada beta (β -CTx o β -CrossLaps). El resto se encuentra de forma natural no isomerizada alfa (α -CTx). Durante el metabolismo óseo normal, el colágeno maduro tipo I se va degradando

desprendiendo estos pequeños fragmentos a la circulación sanguínea. En caso de que aumente la resorción por causas fisiológicas como el envejecimiento, o causas patológicas como la osteoporosis, también va a aumentar la degradación del colágeno, con el consecuente aumento de los fragmentos en sangre. La presencia de la forma no isomerizada (α -CTX) es indicativa de la resorción de hueso joven de síntesis reciente mientras que la presencia de β -CTX indica que se está produciendo la resorción de hueso viejo.

El *International Osteoporosis Foundation* (IOF) y la *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) *Bone Marker Standards* ha seleccionado el β -CTX como marcador de elección para resorción ósea, ya que ha sido evaluado para la predicción de fracturas y el seguimiento de tratamientos contra la osteoporosis. Además, el analito está bien caracterizado y permite el desarrollo de un estándar de referencia claramente definido

Hay que tener en cuenta que presenta ritmo circadiano, con un pico en la segunda mitad de la noche y valle por la tarde. Además, con trastornos renales el valor puede estar incrementado debido a una menor eliminación.

- **Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I (P1NP):**

El colágeno es el principal componente de la matriz ósea. Su precursor, el procolágeno es secretado por los osteoblastos durante la formación ósea. El procolágeno presenta un extremo amino y otro carboxiterminal. Estos extremos (propéptidos) sufren una degradación enzimática durante la formación de la matriz ósea, liberando el colágeno y apareciendo en circulación.

El P1NP es una proteína fosforilada con una región helicoidal en el centro y con alto peso molecular (35000Da). Debido al tamaño, forma y carga eléctrica no puede ser eliminado por orina. Se elimina entre un 20-30% por vía renal, y el 70-80% restante por vía hepática.

Se libera como estructura trimérica, de la estructura trimérica del colágeno, pero rápidamente adquiere estructura monomérica debido a los efectos térmicos de la degradación.

Como los fragmentos de P1NP se liberan durante el proceso de formación de las fibras de colágeno y su incorporación a la matriz ósea, es un buen marcador de formación ósea. Demuestra gran eficiencia diagnóstica en procesos metabólicos que cursan con aumento del remodelado óseo:

- Tras menopausia quirúrgica, es el marcador de formación ósea que presenta mayor sensibilidad diagnóstica (superando FAO y osteocalcina).
- Enfermedad de Paget, donde también hay correlación con los índices de extensión y actividad de la enfermedad.
- Metástasis óseas en cáncer de mama o ginecológicos.

El grupo de trabajo IOF-IFC *Bone Marker Standards* lo ha seleccionado como buen marcador de recambio óseo, ya que ha sido evaluado para predicción de fracturas y seguimiento del tratamiento de la osteoporosis.

En los pacientes con insuficiencia renal, las concentraciones séricas pueden permanecer significativamente elevadas.

Hay variaciones circadianas o estacionales mínimas (aproximadamente un 6 %).

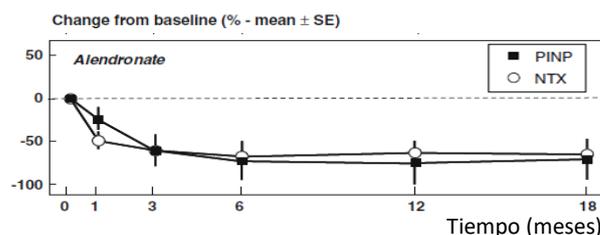


Figura 2. Disminución en los resultados de los marcadores bioquímicos tras tratamiento con terapia antirresortiva (alendronato). Se observa primero una disminución del marcador de resorción (NTX) y posteriormente del de formación ósea (P1NP). Adaptado de Vasikaran S., 2011

UTILIDAD DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO

La principal utilidad de los marcadores óseos es el estudio de la osteoporosis, principalmente para evaluar la adherencia y respuesta al tratamiento así como para predecir el riesgo de fractura. Además, estos marcadores presentan otras utilidades que están siendo estudiadas mediante diversos ensayos y que aún no tienen aplicación en la práctica clínica.

El IOF-IFC *Bone Marker Standards*, recomiendan la utilización de un marcador de resorción (β -CTX) y uno de formación (P1NP) para ser utilizados como marcadores de referencia, en la valoración del riesgo de fractura y la monitorización del tratamiento.

- **Control de la eficacia terapéutica y predicción respuesta al tratamiento:**

Los marcadores óseos aportan información farmacodinámica de la respuesta al tratamiento de la osteoporosis ayudando en la optimización de la terapia.

- **Control de la eficacia terapéutica:**

Actualmente representa el uso clínico mejor establecido. Permite evaluar el cumplimiento de la medicación por parte del paciente en enfermedades crónicas y asintomáticas como la osteoporosis, donde el cumplimiento de la pauta puede suponer una dificultad importante y es esencial para evitar fracturas en un futuro.

Este cumplimiento es especialmente difícil en el caso de los bisfosfonatos orales, que deben tomarse siguiendo una dosificación estricta. La introducción de fórmulas orales semanales o mensuales ha mejorado ligeramente la adherencia al tratamiento.

Para poder evaluar el tratamiento, se debe hacer una determinación antes de comenzar. Posteriormente, la evaluación de la respuesta y su magnitud difieren según el tratamiento y el marcador escogido. La naturaleza de la respuesta es determinada por el mecanismo de acción del fármaco y va a ser diferente según se utilice una terapia antirresortiva o una anabólica.

En relación a la terapia antirresortiva, se ha demostrado que se produce un descenso significativo tanto de los

marcadores de resorción (4-6 semanas), seguido de los de formación (2-3 meses) (Figura 2).

Un cambio significativo supone una reducción de los marcadores de resorción en un 40-70% con un antirresortivo potente (bifosfonatos) y en un 30-40% con anticatabólicos menos enérgicos (reloxifeno).

En la mayoría de los casos se alcanza un valor valle a los 2-3 meses de comenzar el tratamiento y se mantiene constante mientras el paciente continúa con el mismo. Si no se produce una reducción en la concentración de los marcadores óseos podría indicar una mala adhesión al tratamiento por parte del paciente, bien por interrupción del tratamiento, por incumplimiento del régimen de dosificación, o por una administración inadecuada del fármaco.

Por otro lado, con tratamiento osteoformador o anabólico se induce inicialmente un rápido incremento de los marcadores de formación, seguido de un posterior aumento de los de resorción (Figura 3).

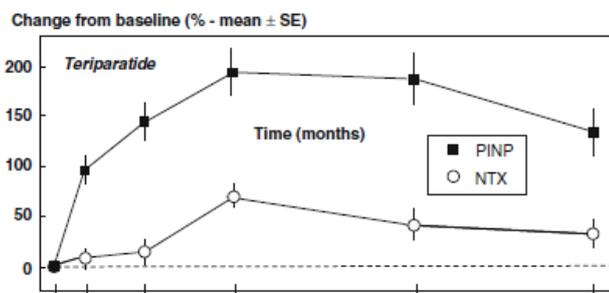


Figura 3. Cambios en los resultados de los marcadores bioquímicos, tras el tratamiento con terapia anabólica (teriparatida). Se observa primero un rápido incremento de los marcadores de formación (P1NP), seguido de los de resorción ósea (NTX). Tomado de Vasikaran S., 2011

Aunque resulta conveniente poder disponer de varios marcadores de formación y de resorción, de acuerdo con la evidencia disponible, los marcadores de remodelado más sensibles y útiles en la clínica son: β -CTx para antirresortivos y P1NP para fármacos anabólicos.

Aunque la DMO se utiliza ampliamente para controlar la respuesta al tratamiento, los incrementos de la DMO inducidos por el tratamiento son modestos (normalmente un 2% al año). Teniendo en cuenta que presenta un error de repetición del 1-2 %, los verdaderos cambios en la DMO sólo se observan varios años después de iniciar el tratamiento. Los cambios inducidos por el tratamiento de los marcadores de recambio óseo son mucho más rápidos y se producen a los 3-6 meses o antes. Se ha señalado a P1NP como marcador con mayor sensibilidad para detectar cambios de DMO en pacientes tratados con teriparatida. Se ha propuesto un algoritmo de actuación en pacientes tratados con este anabólico, en función de la variación detectada en P1NP, en el que incrementos superiores a 10 μ g, 3 meses después del inicio de la terapia, indicarían una respuesta adecuada al mismo.

- Predicción de la respuesta al tratamiento:

Teóricamente podría plantearse que un valor elevado de los marcadores de resorción antes del tratamiento orienta hacia una posible buena respuesta a una terapia antiresortiva, mientras que unos valores bajos de formación pueden indicar

una buena respuesta a terapia anabólica. La buena respuesta en ambos casos se define en términos de aumento de DMO.

Sin embargo, resulta más importante conocer si estos valores de partida van a orientar hacia una reducción del riesgo de fractura, que es el principal objetivo clínico.

En algún estudio se ha visto que el efecto del tratamiento con bifosfonatos produce un mayor incremento de la DMO cuando los valores iniciales de los marcadores son más altos. Además, también se ha visto que este tratamiento puede ser más eficaz en la reducción del riesgo de fractura cuando en concreto, los niveles de P1NP al inicio del mismo permanecían elevados, es decir cuando había alto recambio óseo.

En el caso de los tratamientos anabólicos, contrario a lo esperado, el efecto de la terapia en cuanto a aumento de DMO es mayor en mujeres con niveles más elevados de los marcadores al inicio. Sin embargo, aún no hay suficiente evidencia científica de los resultados de estos marcadores en este tipo de terapia con reducción del riesgo de fractura.

● Predicción del riesgo de fractura:

Aunque el diagnóstico de la enfermedad se basa en la evaluación cuantitativa de la DMO, que es un determinante importante de la resistencia del hueso, la importancia clínica de la osteoporosis radica en las fracturas que se producen, por lo que es importante su predicción.

La DMO medida por DXA ha sido el mejor predictor del riesgo de fracturas, pero tiene el inconveniente de ser una medida estática, donde hay que tener en cuenta otras variables como factores de riesgo o la tasa de recambio óseo.

Se ha visto que un 50% de las mujeres que han sufrido una fractura osteoporótica tienen una DMO superior a la definición de osteoporosis de la OMS. Por tanto, era necesaria la aplicación de herramientas informáticas con las que incorporar factores de riesgo a la DMO, para la evaluación del riesgo de fractura.

La más utilizada es la aplicación informática FRAX, desarrollada en 2008 y que evalúa el riesgo de fracturas más comunes a 10 años (fractura clínica vertebral, antebrazo, cadera u hombro). Los modelos FRAX se han desarrollado a partir del estudio de grupos poblacionales de Europa, América del Norte, Asia y Australia. Se basa en modelos individuales que combinan e integran factores clínicos de riesgo (edad, IMC, fractura anterior, antecedentes familiares de fractura, tabaco, alcohol,...) con la DMO del cuello femoral, en caso de poseer los datos (se puede calcular sin DMO y utiliza el IMC). Como limitación presenta el no incorporar otros factores de riesgo como caídas, marcadores de remodelado óseo, dietas bajas en calcio, deficiencia de vitamina D o densitometrías de otras regiones óseas.

Las alteraciones de la microarquitectura ósea durante el proceso de osteoporosis, que afectan a la calidad del hueso se pueden evaluar utilizando los marcadores bioquímicos. La alteración de estos marcadores supone un factor de riesgo independiente. Niveles elevados de marcadores de resorción se han relacionado con un incremento aproximado del doble de riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales en comparación con mujeres en las que estos marcadores se

presentaban con niveles normales. En este sentido, un enfoque combinado utilizando la DMO y los marcadores bioquímicos de recambio óseo podría mejorar la estratificación del riesgo de fractura en mujeres postmenopáusicas, pudiendo comenzar con un tratamiento precoz. Se ha demostrado que el riesgo aumenta en quienes presentan DMO baja y/o marcadores de remodelación elevados.

- **Predicción de pérdida ósea:**

Con la utilización de estos marcadores también se plantea la posibilidad de identificar a mujeres que van a presentar una tasa alta de pérdida de masa ósea en los años posteriores a la menopausia, y así poder iniciar una estrategia preventiva de la osteoporosis.

La DMO es un importante predictor del riesgo de fractura, pero es una medida estática que aisladamente no permite asegurar la tasa de pérdida ósea. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la variación en los marcadores de recambio óseo sí que puede ser útil en la determinación de la velocidad de pérdida ósea. En concreto, presentan mayor poder predictivo los marcadores de resorción que los de formación.

Se ha descrito que los marcadores de recambio, junto con otras variables demográficas podrían predecir el 30-40% de la variación de la pérdida ósea en mujeres postmenopáusicas no tratadas.

Se plantea la utilización de estos marcadores, que en caso de estar elevados puede indicar una posible pérdida rápida de masa ósea y con ello poder monitorizar precozmente a la paciente mediante DMO. Sin embargo, aún no se ha establecido el umbral a partir del cual se debe intervenir para prevenir la pérdida ósea en mujeres menopáusicas o en personas de tercera edad.

- **Método de cribado para la osteoporosis:**

Como se ha ido describiendo, la evaluación de la DMO mediante DEXA es la prueba de referencia para el diagnóstico de osteoporosis definido por la OMS.

Recientemente, en algún estudio se ha planteado el uso de los marcadores como método de cribado para la osteoporosis al correlacionar variaciones en algunos de estos con disminuciones en la DMO. En concreto, Botella S. *et al.* observan que los marcadores con mejor rendimiento eran β -CTx, P1NP y OC, con curvas ROC de 0,70, 0,71 y 0,64. La sensibilidad y especificidad obtenida fue de 94 y 23% para β -CTx, y de 94 y 50% para P1NP.² Esto sugiere que P1NP y para P1NP se podrían usar como un cribado inicial de osteoporosis, pero en caso de resultado positivo se debe confirmar siempre con DMO.²

Por otro lado, otros autores están en contra de su utilización debido a que los marcadores presentan variación circadiana, variabilidad analítica entre ensayos, y por la falta de valores referencia estandarizados, impidiendo su utilidad para el diagnóstico.

- **Utilidad en otras patologías:**

- Valoración de la actividad en la enfermedad ósea de Paget.
- Detección de metástasis óseas (FAO, P1NP), valorar progresión de enfermedad y/o respuesta al tratamiento en pacientes con patología tumoral.
- Osteodistrofia renal (enfermedad ósea adinámica y osteomalacia)
- Valoración de las características del remodelado y monitorizar la evaluación del tratamiento en enfermedades endocrinas que cursan con alteraciones óseas (hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, enfermedad de Cushing).

Source	Importance	Nature of effect
Uncontrollable sources		
Age	Very important	BTM increase with age in men and women
Menopausal status	Very important	BTM increase within a few months after the last menstrual period
Gender	Very important	BTM are higher in older women than older men
Fractures	Important—limits evaluation of case control studies	BTM increase after a fracture (maximal at 2 to 12 weeks, but effect lasts for up to 52 weeks)
Pregnancy and lactation	Important	BTM are increased during pregnancy; highest levels during third trimester, even higher postpartum
Drugs	Important: corticosteroids, anticonvulsants, heparin, GnRH agonists	BTM may be decreased (glucocorticoids) or increased (anticonvulsants)
Disease	Important: thyroid disease, diabetes, renal impairment, liver disease	BTM often increased (thyrotoxicosis, chronic kidney disease)
Bed rest/immobility	Important	Bone formation markers decrease and resorption markers increase
Geography	Somewhat important	Small changes amongst countries, usually explained by differences in lifestyle
Ethnicity	Not important	Small changes, such as lower OC in African Americans vs. Caucasians
Oral contraception	Not important, except in women over 35 years	Lower values for BTM
Controllable sources		
Circadian	Extremely important	Most striking for bone resorption markers; highest values in second half of night and on waking; lowest values in afternoon and evening
Fasting status	Important for specific markers	Feeding results in a decrease in BTM; for example, s-CTX decreases by 20% after breakfast
Exercise	Important—chronic and acute effects	Changes occur but depend on type of exercise and age of subjects
Menstrual	Not important	Small decreases in bone resorption and increases in bone formation during luteal phase
Seasonal	Not important for individual, but maybe for longitudinal studies	Small decreases in BTM over winter
Diet	Not important	Small reduction in BTM immediately following calcium supplementation

Figura 4. Fuentes inevitables y controlables de factores preanalíticos que afectan a los biomarcadores de recambio óseo, en relación a su importancia y el efecto que producen. BTM: marcadores de remodelado óseo (*Bone turnover markers*). Tomado de Vasikaran S, 2011.

LIMITACIONES DEL USO DE LOS BIOMARCADORES

Como se ha descrito al inicio, la utilización de marcadores tiene muchas ventajas (facilidad en la toma de la muestra, gran disponibilidad de ensayos, posibilidad de seguimiento seriado, información complementaria a DMO, ...). Contrasta con la amplia investigación realizada en los mismos, que aún existe mucha incertidumbre en su aplicación clínica rutinaria.

Esto es por las limitaciones existentes, entre las que se encuentran:

- Variaciones preanalíticas. Debidas a la variabilidad biológica, en ocasiones controlables, pero en otras inevitables (Figura 4). Para reducir esta variabilidad las muestras deben ser recogidas en ayunas y a primera hora de la mañana (evitando el efecto de los alimentos y del ritmo circadiano) y preferiblemente en la misma estación.
- Variaciones analíticas. Depende del método de medida empleado. La automatización ha permitido mejorar la reproducibilidad, pero aún hay falta de estandarización en algunos ensayos, lo que dificulta la obtención de valores comparables entre estudios. Se recomienda la utilización de ensayos automatizados estandarizados cuando estén disponibles.
- Conocimiento inadecuado de las fuentes de variabilidad de cada marcador en concreto.
- Falta de estudio para establecer valores de referencia en determinados grupos poblacionales.
- No disponibilidad de datos sobre la respuesta de varios marcadores a diferentes tratamientos de la osteoporosis y la comparación entre ellos.

Los cambios observables en los marcadores, hay que interpretarlos con cautela y serán relevantes cuando se encuentre una variación significativa, debido a estas variables preanalíticas y analíticas. Al interpretar la respuesta, debe utilizarse el cambio mínimo significativo de cada parámetro, que tiene en cuenta el error de precisión.

Estos puntos fuertes y débiles de los marcadores en la práctica clínica han sido evaluados por una serie de sociedades nacionales y grupos de desarrollo con diferentes recomendaciones para su uso clínico en la evaluación del riesgo y en el seguimiento del tratamiento de la osteoporosis. Algunos apuestan por su uso rutinario, otros prefieren un uso más limitado y hay autores que no recomiendan su utilización.

CONCLUSIONES

Los marcadores de recambio óseo son herramientas importantes para el manejo de la osteoporosis que están ganando aceptación en la práctica clínica en todo el mundo.

Entre las aplicaciones más importantes se encuentran el seguimiento de la adherencia y la respuesta al tratamiento y la estimación del riesgo de fractura.

La IOF y la IFCC recomiendan como marcadores de referencia, la utilización de un marcador de resorción (β -CTx) y uno de formación (P1NP)

Los marcadores se han ido utilizando en la práctica clínica durante varios años, pero aún se necesitan pruebas más sólidas en las que basar la práctica (valores de referencia en grupos de pacientes, comparación entre marcadores y tratamientos, etc.) Es necesaria la comprensión de las variaciones biológicas y preanalíticas, y la disponibilidad de ensayos fiables, rápidos y estandarizados pueden ayudar a una mejor utilización de los marcadores.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

5. Marquez M; Valencia T. Utilidad de la fosfatasa alcalina ósea en la detección de metástasis óseas por cáncer de próstata. Urol. Colomb. 2003. 12(3): 27-31.
6. Botella S, Restituto P, Monreal I, Colina I, Calleja A y Varo N. Traditional and Novel Bone Remodeling Markers in Premenopausal and Postmenopausal Women. J Clin Endocrinol Metab, 2013;98(11):1740–1748

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Bueno Vargas MP. Early programming: efecto de la suplementación con prebióticos de la dieta materna durante la gestación y lactancia sobre el metabolismo óseo de la madre y su descendencia. Universidad de Granada. Tesis Doctorales. 2017.
- Romero Barco CM, Manrique Arijia S y Rodríguez Pérez M. Marcadores bioquímicos en osteoporosis. Utilidad en la práctica clínica. Reumatol Clin. 2012;8(2):149–152.
- Álvarez L, Peris P. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo. Aplicabilidad clínica. Barcelona: Roche Diagnostics; 2002
- Shetty S, Kappor N, Bondu JD, Thomas N, Paul TV. Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. Indian J. Endocrinol. Metab. 2016;20(6):846-852.
- Vasikaran D, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, *et al.* Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. Osteoporos Int. 2011;22:391–420
- Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis. Osteoporosis International. 2019;30:3–44.

EL COBRE: ASPECTOS BIOLÓGICOS GENERALES Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

Autor: Jesús Cabanes Madrid, Ángel Camilo López Regueiro, Daniel Párraga García

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

Palabras clave: Cobre, enfermedad de Menkes, enfermedad de Wilson

INTRODUCCIÓN

Los bioelementos son aquellos elementos químicos que forman parte de los seres vivos. Se pueden clasificar en tres grupos según su proporción en la que se encuentran en la materia viva:

- Bioelementos primarios (99%): carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre.
- Bioelementos secundarios (0.7-0.9%): sodio, potasio, calcio, magnesio y cloro.
- Oligoelementos o elementos traza.

Este último grupo representa solo el 0.1% de la materia viva. Sin embargo, aunque se encuentren en concentraciones de la escala de partes por millón (ppm) o partes por billón (ppb), los oligoelementos cumplen importantes funciones en el organismo.

Según sus requerimientos nutricionales, los elementos traza se pueden clasificar a su vez en esenciales (como el hierro, níquel, zinc o el flúor), posibles esenciales (como el bromo o el plomo) y no esenciales (como el mercurio). Un bioelemento esencial es aquel que es necesario para que se lleve a cabo una función en el organismo, por lo que una disminución de su ingesta llevaría a una alteración de dicha función.

Entre los oligoelementos esenciales también se encuentra el cobre, que es el tercer elemento traza más abundante, después del hierro y del zinc.

GENERALIDADES DEL COBRE

El cobre es un metal de transición que se caracteriza por ser uno de los mejores conductores de la electricidad. Además de sus propiedades químicas y físicas, tiene una importancia biológica vital en las células humanas. Se trata de un micronutriente esencial para el correcto funcionamiento del organismo que se encuentra en diversos órganos que presentan una elevada actividad metabólica, como son el hígado, el cerebro, los riñones y el corazón.

• Funciones:

El cobre actúa principalmente como cofactor enzimático, por lo que las funciones del cobre derivan principalmente de las enzimas que requieren de este elemento para su actividad.

- Integridad del tejido conectivo:

La enzima lisil-oxidasa es una proteína cobre dependiente fundamental para el entrecruzamiento de las moléculas de colágeno y elastina, que son moléculas esenciales en la formación del tejido conectivo. Por ello, el cobre participa en la integridad del tejido conectivo en el corazón y los vasos sanguíneos, en el desarrollo de los huesos y músculos y favorece la cicatrización de las heridas.

- Antioxidante:

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es otra proteína cobre dependiente que funciona como un antioxidante al catalizar la conversión de radicales superóxido a peróxido de hidrógeno, lo cual es necesario para evitar daños irreparables en las células.

- Metabolismo del hierro:

La ceruloplasmina es otra enzima cobre dependiente que presenta actividad ferroxidasa. Esta proteína es necesaria para la oxidación de hierro, lo cual es importante para su movilización y transferencia a la transferrina para ser transportado por la sangre, por ejemplo, para posteriormente ser incorporado por los eritrocitos desarrollados en la médula ósea.

- Síntesis de catecolaminas:

La dopamina hidroxilasa, que tiene como cofactor al cobre, cataliza la conversión de la dopamina en el neurotransmisor noradrenalina.

- Producción de energía:

La citocromo C oxidasa es otra enzima dependiente de cobre que tiene un papel fundamental en la producción de ATP en la cadena de transporte de electrones.

- Formación de mielina:

La mielina es una capa protectora de los nervios formada por fosfolípidos que en cuya síntesis interviene la enzima citocromo c oxidasa, por lo que el cobre también es fundamental para el correcto funcionamiento del sistema nervioso.

- Síntesis de melanina:

La tirosinasa es otra enzima cobre dependiente que participa en la síntesis de la melanina, que es un pigmento producido en los melanocitos de la piel y que es necesaria para la pigmentación del cabello, la piel y los ojos.

- **Mantenimiento del sistema inmunológico:**

El cobre es necesario para el desarrollo y funcionamiento apropiado de las defensas del organismo.

● **Toxicidad:**

Independientemente de todas las funciones descritas, el cobre puede ser a su vez altamente tóxico, ya que en su estado oxidado (Cu^{2+}) participa en reacciones en las que se producen radicales hidroxilo libres, anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) atacan a las biomembranas a través de un proceso de peroxidación lipídica, con lo que desestabilizan su estructura y afectan a las funciones celulares. Las ROS también pueden oxidar directamente a las proteínas y desnaturalizar el ADN y el ARN, provocando daños que contribuyen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas o al envejecimiento celular, por ejemplo. Por ello, es importante mantener las concentraciones de cobre dentro de unos límites.

● **Déficit y excesos del cobre en el organismo:**

Al igual que el resto de minerales presentes en los seres vivos, los organismos no pueden producir cobre, así que solo se puede conseguir a través de la dieta alimentaria. Principalmente este metal se puede obtener de los cereales, frutos secos, legumbres, fruta, y mariscos.

- **Déficit de cobre:**

Unos niveles bajos de este micronutriente pueden darse debido a un fenómeno de malabsorción, a un aumento de las necesidades o a un aumento de las pérdidas del mismo. Cuando se produce dicho déficit, se originan una serie de patologías, entre las cuales destacan:

1. Anemia hipocrómica: debido al déficit de ceruloplasmina se produce una deficiencia de hierro por un defecto en su movilización hacia la sangre.
2. Osteoporosis: esta patología suele ir acompañada de retraso de la edad ósea, y se produce debido a la carencia de la enzima lisil oxidasa, necesaria para la formación del colágeno. Esta alteración enzimática también conduce a la ruptura de vasos sanguíneos y problemas articulares.
3. Pérdida de pigmentación: debido al déficit de la enzima tirosinasa se produce un descenso en la formación de melanina y, como consecuencia, se produce la pérdida de pigmentación en cabellos y piel.
4. Alteración del sistema nervioso: se produce como consecuencia del descenso de la enzima citocromo c oxidasa, junto con el descenso en la formación de la mielina.
5. Otros: debilidad, fatiga, arritmia cardíaca y neutropenia.

- **Exceso de cobre:**

Por el contrario, un aumento de los niveles de cobre suele producirse por ingesta de alimentos contaminados con este mineral. En condiciones patológicas, algunos síntomas de toxicidad aguda por cobre pueden ser: dolor abdominal, calambres estomacales, vómitos, daño hepático severo y fallo renal.

● **Metabolismo:**

Una vez que el cobre ha sido ingerido a través de la dieta, es absorbido en el intestino delgado, a la altura del duodeno. Tras ser captado por los enterocitos duodenales, es exportado a la circulación sanguínea a través de la membrana basolateral de estas células gracias a una proteína transportadora denominada ATP7A. A continuación, unido a la albúmina, la transcupreína y la histidina, el cobre es transportado por la vena porta hasta el hígado. Éste es el órgano de reserva y principal regulador de la homeostasis del cobre, puesto que la excreción biliar es la vía fundamental para la eliminación del metal del organismo.

Allí en el hígado, el cobre se va a incorporar a la ceruloplasmina, por medio del transportador ATP7B, para luego ser llevado a los tejidos y allí ser utilizado en la síntesis de otras proteínas cobre dependientes. Una de ellas es la ceruloplasmina, que se sintetiza en el propio hígado. Es una proteína que contiene de 6 a 8 átomos de cobre, es un reactante de fase aguda positivo y, además, presenta actividad ferroxidasa. El 90% del cobre que circula en el plasma se encuentra unido a la ceruloplasmina, y el resto a la albúmina, transcupreína y a aminoácidos.

Finalmente, el sobrante de cobre en el organismo es excretado a través de la bilis que lo devuelve al intestino. La orina también se comporta como un medio de eliminación de este mineral, aunque solamente se pierde a través de ella un 3%.

● **Métodos de medición:**

Para evaluar el estado funcional de cobre del organismo se han propuesto diversidad de métodos. Por un lado, métodos indirectos como la medición de la actividad catalítica de enzimas cobre dependientes. Por otro lado, existen también métodos directos que miden la concentración o el contenido de cobre en diversos especímenes como son suero, orina y tejido. Entre estos métodos directos destacan dos:

- **Espectrometría de absorción atómica de llama:**

Se basa en que la energía de una llama de aire/acetileno provoca que los átomos de cobre de una disolución se encuentren en estado fundamental y sean entonces capaces, en ese estado, de absorber la radiación característica de 324,7 nm proveniente de una lámpara de cátodo hueco de cobre. Dicha absorbancia medida es proporcional a la concentración del metal en la muestra.

- **Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inducido:**

Se trata de una de las técnicas más novedosas, que se basa en el acoplamiento de un método para generar iones y un método para separar y detectar dichos iones. Concretamente, esta técnica utiliza como fuente de radiación un plasma de acoplamiento inducido y como detector un espectrómetro de masas.

Los iones generados en el plasma pasan a través de un filtro cuadrupolar, que separa a estos iones generados según su relación masa/carga. Cada una de las masas separadas llega al detector, donde se cuantifica el elemento de la muestra.

La ventaja que tiene este último método es que mediante esta técnica es posible determinar de forma cuantitativa la mayoría de los elementos de la tabla periódica a niveles de traza y ultratrazas, partiendo de muestras en disolución acuosa.

PRINCIPALES PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL COBRE

• Enfermedad de Menkes:

La enfermedad de Menkes es un error innato en el metabolismo del cobre que da lugar a un déficit del mismo. Presenta un patrón de herencia ligado al cromosoma X, es de carácter recesivo y con una incidencia anual de 1 en un rango de 40000 a 360000 nacidos vivos. Sin tratamiento, la esperanza de vida de los pacientes es corta, con un máximo de hasta los 3 años. Se caracteriza por presentar alteraciones en el canal ATP7A, el cual se encuentra codificado por el gen *ATP7A*, localizado en la región del brazo largo del cromosoma X.

- Proteína de Menkes:

La proteína ATP7A o proteína de Menkes es un transportador citoplasmático de cobre localizado ampliamente en los tejidos, excepto en el hígado. La expresión del gen *ATP7A* se da principalmente en intestino, músculo, riñón, páncreas y cerebro. En condiciones normales, el canal ATP7A facilita la exocitosis del metal a la sangre, la eliminación del exceso a nivel del intestino, y el ingreso al aparato de Golgi para la síntesis de enzimas cobre dependientes. Concretamente en el cerebro, el transportador está relacionado con la formación de la barrera hematoencefálica en etapas tempranas de la vida.

En la enfermedad de Menkes, el gen que codifica esta proteína está mutado. Debido a esto, conforme se va introduciendo cobre en el organismo a través de la dieta, se genera acumulación del metal en el citosol del enterocito del intestino con impedimento de que salga a la sangre. La incapacidad para la exocitosis genera a su vez un déficit sistémico de cobre originado por la imposibilidad de la absorción intestinal del cobre, puesto que en el intestino predomina la expresión del gen *ATP7A*.

- Clínica:

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Menkes son debidas al déficit de cobre en el organismo. Son variadas y se pueden clasificar en distintas entidades: clásica, leve y síndrome del cuerno occipital.

- 1. Enfermedad de Menkes clásica:** los síntomas tienen un inicio a los 2 o 3 meses de vida, con un compromiso progresivo y severo del neurodesarrollo, hipotermia, hiperlaxitud de extremidades y articulaciones, hipopigmentación y el característico cabello frágil y ensortijado. Esta forma de la enfermedad es de pobre pronóstico.
- 2. Enfermedad de Menkes leve:** en la forma leve de la enfermedad destaca el cabello ensortijado e hiperlaxitud, y un compromiso neurológico menos severo.

- 3. Síndrome del cuerno occipital:** es otra variante de la enfermedad en la que se presentan principalmente anomalías en el tejido conectivo y anomalías óseas en el occipital, mientras que el compromiso neurológico puede ser menos severo o estar ausente.

- Diagnóstico:

El diagnóstico de la enfermedad de Menkes se basa en la sospecha clínica, junto con las pruebas de laboratorio correspondientes. Estas pruebas consisten principalmente en el análisis de los niveles de cobre y de ceruloplasmina en sangre, ya que ambos parámetros se encuentran disminuidos en estos pacientes. También pueden ser de gran utilidad la medición de los niveles de lactato en líquido cefalorraquídeo, que estarán aumentados debido al déficit de la citocromo C oxidasa (componente de la cadena respiratoria) derivado de la deficiencia de cobre. En cambio, los estudios genéticos son limitados por la gran variedad de mutaciones que pueden generar la enfermedad de Menkes.

- Tratamiento:

El tratamiento de esta patología es principalmente sintomático mediante la administración de cobre. La suplementación parenteral temprana con cobre-histidina puede modificar la progresión de la enfermedad al proporcionar cobre adicional a los tejidos y a las enzimas dependientes de cobre. La administración oral de cobre es ineficaz ya que queda retenido en el intestino.

• Enfermedad de Wilson:

La enfermedad de Wilson o degeneración hepatolenticular es un trastorno del metabolismo del cobre que se hereda de forma autosómica recesiva. La prevalencia es de un caso por cada 30000 nacidos vivos. Está causada por mutaciones en el gen *ATP7B* (cromosoma 13) que codifica para el transportador ATP7B, una ATPasa tipo P.

- Proteína ATP7B:

Este canal está implicado en el transporte de cobre dentro de los hepatocitos del hígado, tanto al interior del aparato de Golgi para su incorporación a la apoceruloplasmina como al exterior del hepatocito para la excreción biliar del exceso de metal del organismo.

La distribución intracelular y función de esta ATPasa son sensibles al contenido de cobre en la célula. Cuando éste es normal o bajo, la enzima actúa introduciendo el cobre y cediéndolo a la apoceruloplasmina sintetizada en el hígado, dando lugar a ceruloplasmina. En cambio, en situaciones de sobrecarga de cobre, la ATP7B saturada de este metal se redistribuye pasando a formar parte de vesículas que migran hacia los canalículos biliares promoviendo así la excreción biliar del exceso de cobre.

El defecto en la función de esta proteína da lugar a que, al no poder transportarse el cobre fuera del hepatocito, se acumule en su interior. Cuando se ha sobrepasado la capacidad de los hepatocitos para almacenar cobre, éste se libera a la sangre. Así, la acumulación progresiva de cobre, primero en el hígado y posteriormente en el encéfalo y en otros tejidos, da lugar a las manifestaciones clínicas de esta enfermedad, que son principalmente hepáticas, neurológicas, psiquiátricas y oftalmológicas. Además,

también aumenta su excreción en orina. A su vez, la disfunción del canal ATP7B da lugar a un defecto en la formación de ceruloplasmina al no poder unirse al cobre, por lo que esta proteína se encuentra en una baja concentración plasmática en los pacientes afectados.

- Clínica:

Clínicamente la enfermedad de Wilson puede presentarse como una enfermedad hepática o como un trastorno neuropsiquiátrico progresivo en el que la alteración hepática puede ser menos aparente. Además, lo más frecuente es que se diagnostique entre los 5 y los 35 años.

1. **Manifestaciones hepáticas:** El espectro de enfermedad hepática abarca desde cuadros asintomáticos con hepatomegalia, esplenomegalia o elevación de aminotransferasas que se detectan de forma accidental, hasta casos de fallo hepático fulminante.
2. **Manifestaciones neurológicas y psiquiátricas:** Los pacientes presentan principalmente trastornos del movimiento como distonía, incoordinación y temblores. Algunas personas afectadas por esta patología también poseen algún antecedente de trastornos de la conducta.
3. **Manifestaciones oftalmológicas:** Mediante la realización de una exploración oftalmológica es posible la detección de los llamados anillos de Kayser-Fleischer por depósito del cobre en la córnea, característicos de la enfermedad de Wilson. Tras el tratamiento suele observarse su regresión.

- Diagnóstico:

Para realizar el diagnóstico de la enfermedad de Wilson se requiere la utilización combinada de datos clínicos, bioquímicos y genéticos, siendo inicialmente esencial la sospecha clínica de estos casos. Entre los datos bioquímicos que se valoran en estos casos, destacan cuatro:

1. **Concentración de ceruloplasmina sérica:** Una concentración extremadamente baja (<0,05 g/L) debe ser considerada una fuerte evidencia para el diagnóstico de la enfermedad, aunque disminuciones menos intensas es posible encontrarlas en otras situaciones fisiopatológicas, como cualquier causa de hipoproteinemia.
2. **Concentración de cobre sérico total:** En aquellos pacientes que cursan con fallo hepático agudo, la concentración de cobre sérico puede estar marcadamente elevada debido a la liberación masiva de metal desde el hígado. Al estar disminuidos los niveles de ceruloplasmina, se ve aumentado el porcentaje de cobre libre.
3. **Concentración de cobre en orina de 24 horas:** La excreción de cobre en orina refleja la concentración de cobre sérico no unido a ceruloplasmina en la circulación. Su determinación es para el diagnóstico y para la monitorización del tratamiento. En pacientes sintomáticos se encuentra elevado.
4. **Contenido de cobre en biopsia hepática:** La medición cuantitativa de cobre hepático es considerada la prueba

bioquímica más importante para el diagnóstico de la enfermedad, pero debido a su carácter invasivo se reserva para aquellos casos con sospecha de la enfermedad en los que otras pruebas no muestran resultados definitivos.

- Tratamiento:

El tratamiento farmacológico de la enfermedad de Wilson se basa en el uso de quelantes de cobre. Actualmente el que se encuentra más en uso es la trientina, que actúa uniéndose al cobre del organismo para después ser eliminado en la orina, lo que ayuda a reducir los niveles de cobre.

CASO CLÍNICO

● Historia clínica:

Varón de 63 años en seguimiento por la enfermedad de Wilson. Fue diagnosticado a los 17 años por criterios clínicos. Según describe el paciente, inició los síntomas a los 15 años. Primero comenzó con problemas para articular palabras y caminar, con una marcha a pasos cortos y arrastrando los pies. Progresivamente fue a peor con aparición de un síndrome parkinsoniano grave con temblor y de crisis epilépticas generalizadas recurrentes que desaparecieron tras la administración de los fármacos correspondientes. A los 20 años se le realizó también una biopsia del hígado, con la que se le detectó una cirrosis hepática.

Inició tratamiento con D-penicilamina con práctica resolución de la clínica neurológica, pero desarrolló afectación renal que motivó su retirada. Se cambió por otro fármaco que causó la reaparición de temblor y disartria e intolerancia digestiva, hasta que finalmente comenzó la administración de trientina que es el tratamiento que actualmente mantiene.

● Pruebas bioquímicas de laboratorio:

Cada cierto tiempo, el paciente debe acudir al hospital a extraerse sangre para realizarle un seguimiento y controlar sus niveles de cobre, tanto en suero como en orina de 24h. Los resultados de su última analítica quedan recogidos en la Tabla 1.

PARÁMETRO	RESULTADO	VALOR DE REFERENCIA
Ceruloplasmina (mg/dL)	1	15-30
Cobre en suero (µg/dL)	17.8	70-155
Cobre en orina de 24 horas (µg/24 horas)	172	<40

Tabla 1. Resultados de las pruebas de laboratorio solicitadas para el seguimiento del paciente. Elaboración propia.

Debido a la ausencia de la proteína ATP7B en el paciente, la ceruloplasmina se encuentra en niveles muy bajos al no poderse unir la apoceruloplasmina con el metal. A su vez, debido al tratamiento con quelantes de cobre, el cobre sérico se encuentra disminuido mientras que los niveles de cobre en orina de 24 horas son elevados.

- **Estudio genético:**

El paciente fue derivado a la consulta de genética y, tras el estudio mediante secuenciación masiva del exoma completo y filtrando el análisis para el gen *ATP7B*, se le identificaron en heterocigosis 2 variantes patogénicas. Tras este hallazgo, se le informa al paciente que sería necesario realizar el estudio de ambas variantes a sus hermanos para determinar su estado de portador y poder realizarles un adecuado asesoramiento genético, ya que ambos tienen un riesgo del 50% de ser portadores de una de las dos variantes identificadas.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Llorente Ballesteros MT, et al. Medición del contenido del cobre en especímenes biológicos. *Rev Lab Clin.* 2017; 1-10.
- Feoktistova Victorava L, et al. El metabolismo del cobre. Sus consecuencias para la salud humana. *Medisur.* 2018; 16 (4): 579-587.
- Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger. Principios de Bioquímica. 7ª Edición. España: OMEGA; 2018.
- Feduchi Canosa, E. et al. Bioquímica, Conceptos esenciales. 2ª ed. Editorial Panamericana, 2014.
- Londoño Suárez H.L. Enfermedad de Menkes. *MedUNAB.* 2011; 13(3): 169-172.
- Hernández Villena M.D., López Martínez S. Enfermedad de Wilson. *Rev Lab Clin.* 2011; 4(2): 102-111.

MALABSORCIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

Autor: Celia Amil Manjón, Pilar Duarte García, Aitor Delmiro Magdalena

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

Palabras clave: Lactosa, Fructosa, Hidrógeno y Metano espirado

INTRODUCCIÓN

Los azúcares o hidratos de carbono constituyen una importante fuente de energía para el organismo, ya que suponen el 50-60% de la energía total de la dieta.

Pueden clasificarse según las unidades que los constituyen en monosacáridos (como la glucosa, galactosa y fructosa), disacáridos (formados por dos unidades de monosacáridos, como la lactosa y la sacarosa), oligosacáridos (formados por cadenas cortas de monosacáridos, como la rafinosa) y polisacáridos (constituídos por múltiples unidades, como por ejemplo el almidón).

- **Digestión y absorción de los hidratos de carbono:**

Tras ser ingeridos con la dieta alcanzarán el intestino delgado, donde van a ser hidrolizados por distintas enzimas hasta sus formas monoméricas, que son las que posteriormente serán absorbidas por la mucosa del intestino mediante diferentes transportadores.

Dentro de las enzimas encargadas de la digestión de los azúcares destacan:

- La α -amilasa (salival y pancreática): encargada de romper los enlaces α -1,4 de las cadenas de glucosa que forman el almidón.
- Disacaridasas: presentes en la membrana del borde en cepillo del enterocito, dentro de las cuales destacan:
 - La lactasa, para la digestión de la lactosa.
 - El complejo sacarasa-isomaltasa, encargado de la hidrólisis de la sacarosa, la maltosa y las dextrinas procedentes de la degradación del almidón.
 - La glucoamilasa, que hidroliza también la maltosa y los oligómeros de glucosa procedentes del almidón.

Los principales transportadores encargados de la absorción de los monosacáridos son:

- SGLT1: es el principal transportador encargado de la absorción de glucosa y galactosa por cotransporte con sodio, y se sitúa en la membrana apical del enterocito.
- GLUT2: es un transportador de glucosa que se sitúa en la membrana basal, y que también es capaz de cotransportar fructosa y galactosa.
- GLUT5: encargado de la absorción por difusión pasiva de la fructosa en la membrana apical del enterocito. Como es un transportador saturable, va a hacer que la cantidad de fructosa absorbible en la dieta esté limitada.

Cuando se produce alguna alteración en cualquiera de estos procesos, ya sea por defectos en la expresión de las enzimas

encargadas de su degradación (como en el caso de la lactasa o la sacarasa) o en la expresión de los transportadores necesarios para su absorción (como sucede con los de la fructosa o la galactosa) nos encontramos ante los síndromes de malabsorción de hidratos de carbono.

- **Fisiopatología y Sintomatología**

Al no poder absorberse, estos azúcares se acumulan en el intestino delgado y aumentan la osmolaridad, el paso de agua a la luz intestinal y con ello la estimulación del peristaltismo intestinal. Además, al llegar al intestino grueso las bacterias que conforman la microbiota intestinal los fermentarán, y generarán ácidos orgánicos como el ácido láctico, ácidos grasos de cadena corta y gases como el dióxido de carbono (CO₂), el hidrógeno (H₂) y el metano (CH₄).

Todos estos procesos van a ser los responsables de los síntomas característicos de estas patologías, que comprenden síntomas intestinales tales como distensión y dolor abdominal, náuseas, flatulencia y diarrea.

Estos síntomas son similares para los diferentes síndromes de malabsorción de azúcares, por lo que el diagnóstico diferencial es crucial y se basará en determinar el hidrato de carbono responsable de desencadenar todo el proceso para así poder eliminarlo de la dieta.

TIPOS DE MALABSORCIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

Dentro de los trastornos más frecuentes destacan la malabsorción de lactosa y de fructosa, pero existen otras enfermedades importantes como el déficit de glucoamilasa, el déficit congénito de sacarasa-isomaltasa y la malabsorción congénita de glucosa-galactosa (trastorno de herencia autosómica recesiva debido al déficit del transportador SGLT1).

- **Malabsorción de lactosa**

La lactosa es un disacárido presente en la leche de los mamíferos que está formado por una molécula de glucosa y una de galactosa unidas por un enlace β 1,4.

La lactasa (beta-galactosidasa) presente en la membrana del borde en cepillo de los enterocitos es la enzima encargada de la digestión de la lactosa a través de la ruptura de este enlace, liberando glucosa y galactosa que serán posteriormente absorbidas.

La intolerancia a la lactosa se produce como consecuencia de la deficiencia en lactasa. Este déficit provoca la acumulación de lactosa en el intestino y su fermentación por

parte de la flora bacteriana, lo que origina los síntomas digestivos típicos como malestar abdominal y diarrea.

La lactosa se encuentra principalmente en los productos lácteos, aunque también está presente en otros alimentos para mejorar el sabor, la textura y como conservante. También se emplea en la industria farmacéutica como excipiente de muchos medicamentos.

- Clasificación

Según su origen, la malabsorción de lactosa puede clasificarse en una deficiencia primaria o adquirida. En el primer caso podemos distinguir a su vez la deficiencia congénita, que consiste en la ausencia total de lactasa por mutaciones en el gen que la codifica y que afecta al recién nacido; y la hipolactasia del adulto, que suele ser la más frecuente y se caracteriza por una disminución de la expresión de la enzima tras la infancia.

Por otro lado, la deficiencia adquirida se origina por otros motivos que pueden ser de tipo infeccioso o inflamatorio (como la enfermedad de Crohn y la celiaquía). Éstos generan un daño en la pared intestinal que afecta a las enzimas presentes en ella, pero que, a diferencia de los otros tipos, es reversible al eliminar el factor causante.

- Hipolactasia del adulto o déficit primario adquirido de lactasa

En estos pacientes la actividad de la lactasa es normal en la infancia, y lo que tiene lugar es una disminución progresiva de la expresión de la enzima a partir de los 5-8 años de edad que desemboca en una actividad residual variable (de entre un 10% y un 30%) en la edad adulta.

Se debe a la existencia de ciertos polimorfismos en la región reguladora del gen que codifica la lactasa (gen *LCT*, en el cromosoma 2) y que dan lugar a la existencia de dos fenotipos posibles: lactasa persistente y lactasa no persistente. Los individuos con fenotipo lactasa no persistente presentan un genotipo C/C en la posición 13910 y G/G en la 22018, mientras que los genotipos C/T y T/T o G/A y A/A respectivamente, son lactasa persistente y mantienen niveles de lactasa similares a los de la infancia.

Además, se ha observado que la prevalencia de cada fenotipo está condicionada por factores raciales o por el consumo habitual de leche en esa población: por ejemplo, entre el 90-97% de la población asiática es lactosa no persistente, y en África Ecuatorial y Centroamérica en torno a un 85%, mientras que en Europa este perfil es menos común, alrededor de un 5% en el norte y en torno al 20% en los países mediterráneos del sur.

- Diagnóstico

Existen diferentes opciones disponibles para el diagnóstico de la malabsorción de lactosa, ya que la sintomatología por sí misma es muy inespecífica. Algunas de ellas se emplean también en el diagnóstico de la malabsorción de otros hidratos de carbono.

1. **Determinación de la actividad enzimática:** consiste en la determinación de la actividad lactasa (o de la enzima implicada si se tratara de otro azúcar) en el borde de cepillo del enterocito a partir de una biopsia intestinal.

Sin embargo, no suele realizarse ya que se trata de un método invasivo y debe tenerse en cuenta que la distribución de las disacaridasas no es constante a lo largo de todo el intestino, por lo que puede originar resultados falseados.

2. **Cribado de azúcares:** determinación del pH, presencia de azúcares y cuerpos reductores en heces que confirmen la presencia de los azúcares no absorbidos o de los ácidos orgánicos procedentes de su fermentación. Se trata de un método barato y sencillo que permite confirmar las sospechas de malabsorción de azúcares y orientar el diagnóstico hacia la molécula responsable.
3. **Test genético:** en el caso de la lactosa, consiste en determinar el polimorfismo presente en el individuo para saber si es o no lactasa persistente, pero solo informará de la predisposición de la persona a desarrollar esta alteración y no de la actividad lactásica real en ese momento.
4. **Test del aliento con un sustrato marcado con isótopo estable (¹³C):** se realiza administrando el azúcar marcado y determinando posteriormente la presencia de CO₂ marcado en el aliento, lo que indicará que la glucosa presente en la lactosa ha sido absorbida y metabolizada. Sin embargo, este método también presenta algunos inconvenientes, ya que existen múltiples factores condicionantes a tener en cuenta (como el ejercicio, la ingestión de ciertos alimentos, o ciertas enfermedades) que van a afectar a la producción y la eliminación de CO₂, modificando los resultados.
5. **Prueba de tolerancia o sobrecarga oral:** consiste en la administración de una solución de lactosa y la posterior determinación de los niveles de glucosa en sangre cada 30 minutos para valorar el nivel de absorción. En el caso de que la lactosa no sea absorbida, estos no aumentarán, mientras que un aumento de los valores superior a 25 mg/dL indica que el azúcar sí es absorbido.

La principal ventaja es que puede emplearse para mejorar la precisión del diagnóstico combinándola con otros métodos como el test de hidrógeno/metano espirado, en el que también se administra una solución del azúcar implicado.

Sin embargo, se trata de una prueba invasiva que requiere múltiples extracciones de sangre y la administración de una solución de lactosa que generará sintomatología en individuos afectados. Además, va a depender del metabolismo de la glucosa de cada persona, y puede presentar falsos resultados en diabéticos, pacientes con sobrecrecimiento bacteriano o en situaciones con alteración del tránsito intestinal y del peristaltismo.

6. **Test del hidrógeno (H₂) y metano (CH₄) espirado:** es el método más utilizado para el diagnóstico de la malabsorción de hidratos de carbono.

Cuando las bacterias del intestino fermentan los azúcares que no han sido absorbidos, dan lugar a la

producción de diferentes gases que posteriormente difundirán a la circulación para ser eliminados en la respiración por los pulmones. Esto puede aprovecharse para diagnosticar la malabsorción mediante la administración de una solución del azúcar sospechoso y la cuantificación posterior de las concentraciones de H₂ y CH₄ en el aire espirado a intervalos de tiempo de 30 minutos durante unas 3-4 horas.

Para la realización de la prueba el paciente debe acudir en ayunas de al menos 10 horas, para asegurar que los niveles de H₂ y CH₄ basales sean menores a 10 ppm. El test se considera positivo si se produce un aumento superior a 20 ppm de H₂ o a 10 ppm de CH₄ respecto al nivel basal a partir de los 90 minutos.

En cuanto a los equipos empleados para su determinación, se incluyen la cromatografía de gases y equipos con sensores electroquímicos basados en la medida del potencial.

Uno de los principales problemas a tener en cuenta en la realización del test del hidrógeno es que no existen unos valores estandarizados en cuanto a las indicaciones, las dosis y los puntos de corte. La Guía de Consenso Norteamericana de 2017¹ establece recomendaciones con el objetivo de unificar y mejorar los criterios de la prueba:

La duración es larga, ya que es necesario esperar a que los sustratos alcancen el colon, se metabolicen y que el H₂ y el CH₄ lleguen hasta los pulmones. Actualmente se recomienda una duración de 3h, ya que se ha comprobado que suele ser suficiente para detectar un aumento de los niveles de los gases mencionados.

En cuanto a las dosis administradas, normalmente se administran 50g de lactosa. Sin embargo, actualmente se busca reducir esta dosis a niveles más fisiológicos, por lo que se recomienda emplear 25g.

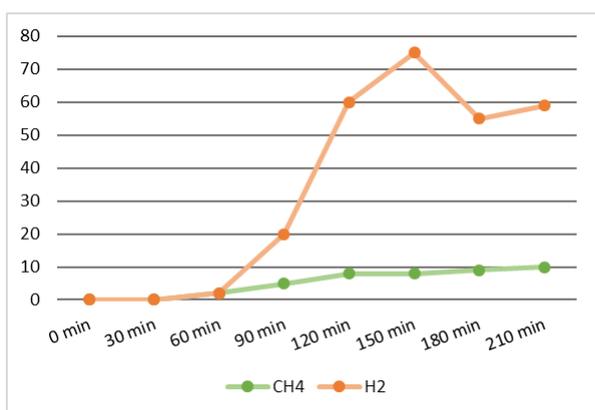


Figura 1. Ejemplo de test de hidrógeno espirado positivo. Adaptado de: Codoceo R *et al*, 2019.

Entre las principales ventajas de este test destaca el hecho de que es un método no invasivo y sencillo de realizar. Sin embargo, presenta el inconveniente de que va a desencadenar sintomatología y molestias abdominales en los pacientes intolerantes, que además deben permanecer mucho tiempo en el hospital para realizar la prueba. También que es necesario disponer

de un equipamiento sofisticado para su realización así como personal dedicado el tiempo que dura la prueba.

Además, hay que tener en cuenta que pueden producirse interferencias por múltiples situaciones que van a llevar tanto a falsos negativos como a falsos positivos. Algunas de estas situaciones incluyen:

- Alteraciones de la microbiota tras tratamientos antibióticos.
- Enfermedades que alteren el tiempo de tránsito intestinal.
- Pacientes que presentan una flora con bacterias metanogénicas (que consumen el H₂ para producir en su lugar metano). Se estima que estos pacientes suponen un 20-30% del total, por lo que actualmente para mejorar la sensibilidad de la prueba se recomienda la determinación conjunta de ambos gases (H₂ y CH₄), permitiendo detectar este porcentaje de pacientes que de otra forma quedaría sin diagnosticar.

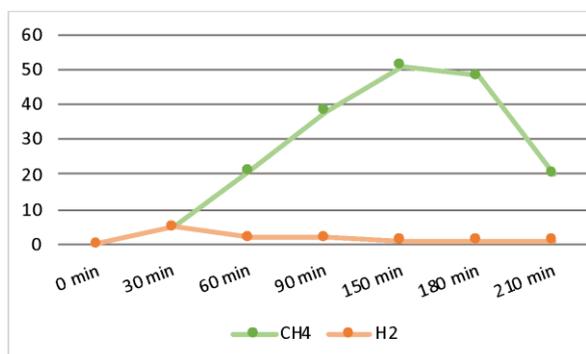


Figura 2. Ejemplo de test de hidrógeno con elevación de metano. Adaptado de: Codoceo *et al*, 2019.

- Por último, hay que tener en cuenta que pueden producirse falsos positivos por la presencia de sobrecrecimiento bacteriano, que consiste en un aumento de la concentración de bacterias en el intestino delgado. Estas fermentarán los azúcares de forma prematura, causando un aumento de H₂ y/o CH₄ espirado antes de tiempo. Para su diagnóstico se usa también un test de aire espirado, pero empleando una solución de glucosa o lactulosa.
7. **Prueba de la gaxilosa LacTEST:** se administra a los pacientes una solución de gaxilosa (4-O-β-D-galactopiranosil-4-xilopiranososa), que es un disacárido sintético análogo de la lactosa formado por xilosa y galactosa.

En el intestino este azúcar es sustrato de la lactasa, de forma que en aquellos pacientes con una actividad normal de lactasa se separará en ambos monosacáridos, que serán absorbidos y pasarán a la circulación (Figura 3). Una vez en la sangre la xilosa se metabolizará solo parcialmente en el hígado (aproximadamente en un 50%), mientras que el resto será filtrado por los riñones y excretado de forma inalterada en la orina. Los niveles de xilosa en orina se determinarán posteriormente en el laboratorio y en los

pacientes intolerantes a la lactosa, al no poder digerir el disacárido, no se detectará xilosa en su orina.

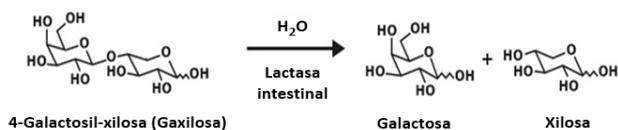


Figura 3. Reacción de hidrólisis de la gaxilosa.

Adaptado de: Producto LacTEST [Internet]. Venter Pharma.

La dosis recomendada de sustrato es de 0,45 g de gaxilosa en 100 mL de agua. Los pacientes deberán estar en ayunas y vaciar la vejiga entre 15-30 minutos antes de la prueba, tomar la solución y posteriormente beber hasta un máximo de 500 mL de agua para facilitar la diuresis. Se recogerá la orina durante las siguientes 5 horas.

La determinación de la cantidad de xilosa en la muestra puede realizarse en analizadores automáticos mediante un kit enzimático (Xylossay®). Este método emplea la reacción de la xilosa deshidrogenasa, que oxida la xilosa a xilonolactona en presencia de NAD⁺, midiéndose la absorbancia del NADH formado a 340nm.²

La prueba se considera positiva, y por tanto el paciente será diagnosticado como hipolactásico, con una cantidad total de xilosa inferior a 19,18 mg, mientras que por encima de estos valores se considerará que el paciente no presenta una malabsorción de lactosa.

Además, también existiría la posibilidad de determinar la concentración de xilosa en suero, que indicaría igualmente si el disacárido ha sido digerido o no. Este método podría emplearse en aquellos pacientes en los que la recogida de orina puede ser más problemática, como los pacientes ancianos o niños.

Una de las principales ventajas de esta prueba en comparación con otros métodos como el test del aire espirado es su sencillez, ya que no requiere equipos muy complejos ni una interpretación posterior de los gráficos obtenidos. Solo es necesario determinar la concentración de xilosa en la muestra y calcular la cantidad total presente en ella.

Por otro lado, se trata de una prueba no invasiva y más cómoda en cuanto a la toma de muestra, ya que el paciente puede realizarla en su casa y llevarla posteriormente al hospital.

Por último, las dosis de sustrato necesarias son mucho menores, por lo que son mejor toleradas y no causan ningún tipo de síntoma en la mayoría de los casos.

Como inconvenientes destaca el hecho de que no es válida en pacientes con enfermedad renal grave, ya que la excreción en orina de la xilosa va a estar disminuida; ni tampoco está indicada en aquellos que presenten diabetes, alteraciones del vaciamiento gástrico o hipertensión portal.

En el ensayo realizado por Aragón JJ *et al.*, se compararon los resultados del test de gaxilosa en 205

pacientes con la biopsia intestinal (que es el método de referencia) y también con el test de hidrógeno espirado y la sobrecarga de lactosa. Se observó que el test de gaxilosa presentaba un área bajo la curva superior (Figura 4). Además, tanto la especificidad y la sensibilidad como los valores predictivos positivo y negativo fueron superiores al 90% y por tanto mayores a los obtenidos para el test del hidrógeno y de la sobrecarga oral (que estaban en torno al 70-80%)³.

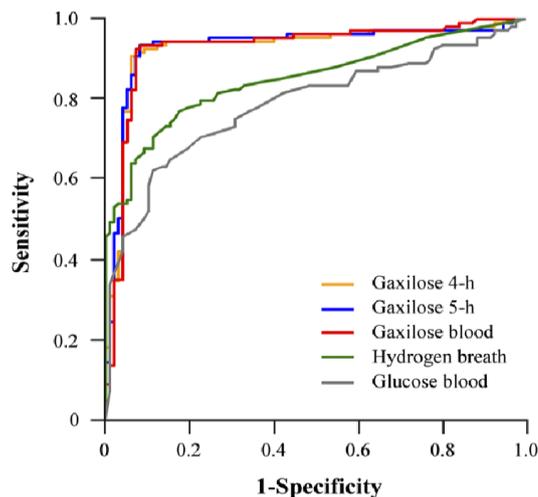


Figura 4. Curva ROC comparativa para el ensayo de gaxilosa. Tomado de: Aragón JJ *et al.*, 2014.

• Malabsorción de fructosa y sorbitol

La fructosa destaca también dentro de los principales azúcares implicados en la malabsorción de hidratos de carbono. Es importante diferenciar entre la intolerancia a la fructosa (una enfermedad hereditaria causada por la deficiencia en alguna de las enzimas hepáticas que participan en su metabolización) y la malabsorción de la misma.

En el caso de la malabsorción de fructosa, aún existe cierta falta de conocimiento sobre el proceso de absorción de este azúcar y de los mecanismos implicados en la patología.

Se sabe que GLUT5 es un transportador específico de fructosa que se encuentra en la membrana apical del enterocito, por lo que se ha propuesto que la malabsorción sea debida a una menor expresión de este transportador. Sin embargo, se cree que existen otros transportadores (como GLUT2 y SGLT4) que también participan en la absorción de fructosa y que podrían tener algún papel en la explicación bioquímica de la malabsorción.

Por ejemplo, se ha observado que la administración conjunta de glucosa con fructosa disminuye la sintomatología de estos pacientes y por tanto mejora su absorción. De hecho, aquellas frutas que presentan proporciones similares de glucosa y fructosa, como las uvas o los pomelos, tienen una mejor tolerancia que otras en las que la proporción de fructosa es mucho mayor. Esto puede deberse a la acción del transportador GLUT2, que además de glucosa y galactosa, es capaz también de cotransportar moléculas de fructosa. Este transportador se encuentra en la membrana basal del enterocito, y se ha propuesto su posible presencia

en la membrana apical, lo que ayudaría en parte a la absorción de la fructosa. Otra posibilidad sería que la glucosa produzca un retraso del vaciamiento gástrico, favoreciendo la llegada de la fructosa al intestino de forma progresiva y facilitando así su absorción.

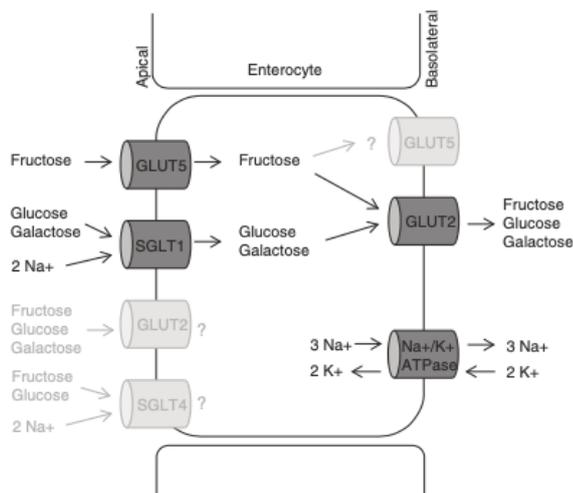


Figura 5. Mecanismos de absorción de azúcares. Tomado de: Ebert K *et al*, 2016.

Sin embargo, en un estudio de Wilder-Smith *et al.*⁴ compararon la expresión de ARNm y de las proteínas de los transportadores GLUT2 y GLUT5 entre pacientes con malabsorción de fructosa y pacientes control, y no se encontraron diferencias significativas entre ambos, lo que cuestiona que realmente la enfermedad esté debida a una disminución en la expresión de estos transportadores. Aun así, pueden estar implicadas otras causas a nivel de su activación, su localización subcelular o la abundancia en la membrana.

Por otro lado, se sabe que la absorción de fructosa se relaciona con la edad, pero a diferencia de la intolerancia a la lactosa en este caso la capacidad de absorción es menor en niños pequeños y va aumentando progresivamente hasta alcanzar niveles normales en torno a los 10 años.

En la dieta, la fructosa se encuentra principalmente en la fruta y las verduras, forma parte de la sacarosa y también se encuentra en elevada proporción en edulcorantes artificiales como el jarabe de glucosa-fructosa. En cuanto al sorbitol, es también muy utilizado como edulcorante y espesante. Estos productos son cada vez más empleados en la industria alimentaria y forman parte de múltiples alimentos, principalmente zumos y refrescos. Este aumento que se ha producido en su consumo es en parte responsable del incremento en el número de casos de malabsorción de fructosa y sorbitol en los últimos años.

El diagnóstico suele realizarse por la medida de H₂ y CH₄ espirado tras la administración de fructosa. Sin embargo, es importante tener en cuenta las dosis a emplear, ya que se ha visto que a elevadas dosis el transportador se satura causando síntomas también en personas sanas. Por este motivo, las dosis deben ajustarse para evitar falsos positivos. La recomendación de la Guía de Consenso Norteamericana de 2017 es administrar 25g de fructosa¹.

Finalmente, una vez realizado el diagnóstico, el tratamiento va a consistir en eliminar el consumo de fructosa de la dieta o reducirlo a dosis que la persona pueda tolerar.

CONCLUSIÓN

La malabsorción de hidratos de carbono se debe a alteraciones en las enzimas o transportadores que participan en su digestión, causando síntomas digestivos como diarrea y dolor abdominal.

El método de diagnóstico más empleado suele ser el test de aire espirado, que se basa en la detección del gas producido en la fermentación de los azúcares por la microbiota del colon. Actualmente, la determinación conjunta de hidrógeno y metano, o la introducción de alternativas como el test de gaxilosa, suponen un importante avance en la precisión del diagnóstico y la comodidad de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Rezaie A, Buresi M, Lembo A, Lin H, McCallum R, Rao S, Schmulson M, Valdovinos M, Zakko S, Pimentel M. Hydrogen and Methane-Based Breath Testing in Gastrointestinal Disorders: The North American Consensus. *Am J Gastroenterol.* 2017;112(5):775-784.
2. Instrucciones generales Xylossay® [Internet]. Venter Pharma. [citado 24 jun 2023]. Disponible en: https://venterpharma.com/wp-content/uploads/2021/06/11-mL_Instrucciones-Generales-Espanol.pdf
3. Aragón JJ, Hermida C, Martínez-Costa OH, Sánchez V, Martín I, Sánchez JJ, Codoceo R, Cano JM, Cano A, Crespo L, Torres Y, García FJ, Fernández-Mayoralas A, Solera J, Martínez P. Noninvasive diagnosis of hypolactasia with 4-Galactosylxylose (Gaxilose): a multicentre, open-label, phase IIB-III nonrandomized trial. *J Clin Gastroenterol.* 2014;48(1):29-36.
4. Wilder-Smith CH, Li X, Ho SS, Leong SM, Wong RK, Koay ES, Ferraris RP. Fructose transporters GLUT5 and GLUT2 expression in adult patients with fructose intolerance. *United European Gastroenterol J.* 2014;2(1):14-21.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Aragón JJ, Hermida C, Martínez-Costa OH, Sánchez V, Martín I, Sánchez JJ, Codoceo R, Cano JM, Cano A, Crespo L, Torres Y, García FJ, Fernández-Mayoralas A, Solera J, Martínez P. Noninvasive diagnosis of hypolactasia with 4-Galactosylxylose (Gaxilose): a multicentre, open-label, phase IIB-III nonrandomized trial. *J Clin Gastroenterol.* 2014;48(1):29-36.
- Benardout M, Le Gresley A, ElShaer A, Wren SP. Fructose malabsorption: causes, diagnosis and treatment. *Br J Nutr.* 2022;127(4):481-489.

- Codoceo R, Muñoz C, Ariza M.J, Muñoz R.A. Test del hidrógeno (H₂) espirado: Metodología e indicaciones. SEGHN. Madrid: Ergon; 2019.
- Ebert K, Witt H. Fructose malabsorption. *Mol Cell Pediatr.* 2016;3(1):10.
- Prieto G, Fernández B. Malabsorción de hidratos de carbono. *An Pediatr Contin.* 2014;12(3):111-8.
- Producto LacTEST [Internet]. Venter Pharma [citado 24 jun 2023]. Disponible en: <https://venterpharma.com/lactest>
- Rezaie A, Buresi M, Lembo A, Lin H, McCallum R, Rao S, Schmulson M, Valdovinos M, Zakko S, Pimentel M. Hydrogen and Methane-Based Breath Testing in Gastrointestinal Disorders: The North American Consensus. *Am J Gastroenterol.* 2017;112(5):775-784.
- Venter Pharma. Ficha Técnica LacTEST 0,45 g polvo para solución oral [Internet]. Madrid: AEMPS; 2019 [citado 24 jun 2023]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/75797/75797_ft.pdf
- Wilder-Smith CH, Li X, Ho SS, Leong SM, Wong RK, Koay ES, Ferraris RP. Fructose transporters GLUT5 and GLUT2 expression in adult patients with fructose intolerance. *United European Gastroenterol J.* 2014;2(1):14-21.

EL LABORATORIO EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS PORFIRIAS

Autor: Ylenia Pérez Arnaiz, Ilenia Liria González, Silvia Díaz Díaz

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

Palabras clave: porfiria aguda, porfiria cutánea, estudio bioquímico

INTRODUCCIÓN

Las porfirias constituyen un grupo de enfermedades hereditarias poco frecuentes, producidas por alteraciones en la actividad de las enzimas implicadas en la biosíntesis del grupo hemo. La actividad reducida de alguna de estas enzimas se traduce en una sobreproducción y acúmulo de porfirinas y sus precursores.

• Síntesis del grupo hemo:

El grupo hemo funciona como grupo prostético de numerosas proteínas que intervienen en procesos relacionados con el O₂. Entre estos se encuentran su transporte (hemoglobina), su almacenamiento (mioglobina), la respiración mitocondrial (citocromos mitocondriales), la destrucción de peróxidos (catalasa, glutatión-peroxidasa) o el metabolismo oxidativo (citocromo P450, citocromo b5-monooxigenasas).

El grupo hemo es sintetizado por todas las células, excepto los hematíes, aunque esta producción se da principalmente en los eritroblastos (médula ósea) y los hepatocitos. Esta síntesis tiene lugar, principalmente, en el citoplasma, a excepción del primer paso y los tres últimos que se producen en la mitocondria. (Figura 1).

La primera reacción de esta ruta biosintética consiste en la condensación de una molécula de succinil-CoA y una molécula de glicina dando lugar a 5-aminolevulinato (5-ALA). Esta reacción está catalizada por la enzima 5-aminolevulinato-sintasa.

El 5-aminolevulinato migra desde la mitocondria hasta el citosol para ser condensado con otra molécula de 5-aminolevulinato por la enzima porfobilinógeno-sintasa formando porfobilinógeno (PBG).

Posteriormente, la hidroximetilbilano-sintasa cataliza la unión de cuatro moléculas de porfobilinógeno para formar hidroximetilbilano. Este puede convertirse lentamente en uroporfirinógeno I por ciclación espontánea o bien en uroporfirinógeno III por la acción de la enzima uroporfirinógeno III-sintasa. La diferencia entre estos isómeros radica en la disposición de la cadena lateral pero únicamente el uroporfirinógeno III continúa la vía de la biosíntesis del grupo hemo.

Antes de pasar a la mitocondria, el enzima uroporfirinógeno-decarboxilasa oxida de forma secuencial cuatro grupos metilcarboxilato generando coproporfirinógeno I o III en función del uroporfirinógeno oxidado.

El coproporfirinógeno III pasará a la mitocondria donde la coproporfirinógeno-oxidasa, que actúa únicamente sobre el isómero III, forma el protoporfirinógeno IX.

Posteriormente, la protoporfirinógeno-oxidasa cataliza la formación de protoporfirina IX y finalmente, la ferroquelatasa, cataliza la inserción de Fe²⁺ en la protoporfirina IX.

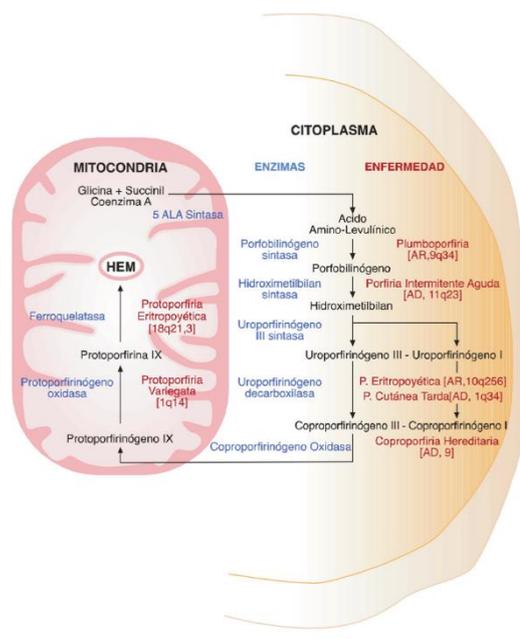


Figura 1. Ruta biosintética del grupo hemo. La enzima deficitaria produce la acumulación de distintos compuestos de la ruta dando lugar a los diferentes tipos de porfiria. Tomada de: Buitrago, J y col, 2009.

• Características químicas de las porfirinas:

Las porfirinas son los productos estables derivados de la oxidación de porfirinógenos. Estos porfirinógenos son intermediarios inestables, incoloros y no fluorescentes y que se oxidan rápidamente a porfirinas.

Debido a la estructura de dobles enlaces del anillo, las porfirinas absorben fuertemente luz a 405 nm, lo que se conoce como banda de Soret, emitiendo fluorescencia rojiza entre 550 y 650 nm.

La polaridad de las porfirinas y, en consecuencia, su solubilidad en agua, depende del número de carboxilos presentes en el anillo pirrólico. Esto es importante tenerlo en cuenta ya que, dependiendo de la polaridad, se verá modificada la excreción de porfirias en fluidos biológicos. La uroporfirina presenta ocho grupos carboxilos siendo la porfirina más soluble en agua, excretándose a través de la orina. Por otro lado, la protoporfirina solo presenta dos grupos carboxilos siendo muy lipófila por lo que se elimina a través de las heces. Existen porfirinas de solubilidad intermedia como la coproporfirina que posee cuatro grupos

Nombre	Enzima afectada	Herencia	Porfirias mixtas
Deficiencia de porfobilinógeno- sintasa	Porfobilinógeno- sintasa	AR	No
Porfiria aguda intermitente	Hidroximetilbilano-sintasa	AD	No
Coproporfiria hereditaria	Coproporfirinógeno oxidasa	AD	Sí
Porfiria variegata	Protoporfirinógeno-oxidasa	AD	Sí

Tabla 1. Porfirias agudas. Adaptado de: González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y biología molecular.

carboxílicos y se elimina tanto por las heces como por la orina.

- **Clasificación**

Desde el punto de vista clínico las porfirias se pueden clasificar en porfirias hepáticas o porfirias eritropoyéticas según el lugar donde se produzca la sobreproducción del grupo hemo; o bien en porfirias agudas, cutáneas o mixtas, según la sintomatología. Esta última clasificación es la que se va a emplear a lo largo del capítulo.

PORFIRIAS AGUDAS

La prevalencia de las porfirias agudas en su conjunto es baja por lo que pueden considerarse enfermedades raras. Además, la penetrancia clínica es baja, en torno a un 10 o un 20% lo que quiere decir que solo un 10-20% de los individuos con alteración genética sufrirá un ataque agudo de porfiria. Esto pone de manifiesto la importancia de los factores ambientales para el desarrollo de una crisis de porfiria aguda.

Existen cuatro tipos de porfirias agudas: déficit de PBG sintasa, porfiria aguda intermitente, coproporfiria hereditaria y porfiria variegata; siendo estas dos últimas realmente porfirias mixtas. (Tabla 1).

- **Manifestaciones clínicas:**

Las porfirias agudas no suelen manifestarse antes de la pubertad, a excepción de aquellos afectos homocigotos y heterocigotos compuestos, que pueden presentar síntomas a edades más tempranas.

La aparición de síntomas es más frecuente en mujeres. Esto es así debido a que la producción de progestágenos durante la fase lútea del ciclo menstrual es un potente desencadenante de crisis porfíricas.

Los ataques agudos de porfirias se caracterizan por un intenso dolor abdominal que puede irradiar a espalda y extremidades. Puede acompañarse de alteraciones del sistema nervioso autónomo como estreñimiento, náuseas, vómitos, hipertensión y taquicardia. Estos dos últimos signos junto con la aparición de orina de color oscuro o rojizo son claves para la sospecha inicial de una crisis aguda. Durante estas crisis, los pacientes también pueden presentar alteraciones del sistema nervioso central como agitación o convulsiones y alteraciones del sistema nervioso periférico como alucinaciones y debilidad. Si la crisis no se diagnostica y se trata de forma adecuada, puede complicarse con neuropatía motora periférica, tetraparesia e incluso la muerte.

- **Patogénesis y fisiopatología:**

Independientemente del defecto enzimático, el mecanismo fisiopatológico que va a desencadenar una crisis aguda es el exceso de actividad del enzima ALAS-1 debido a una regulación positiva descontrolada. Diferentes factores como el ayuno, las hormonas sexuales femeninas, el estrés, el tabaco o el alcohol pueden actuar como factores desencadenantes de una crisis aguda al activar al enzima ALAS-1. Esta inducción, en combinación con el defecto enzimático en la ruta biosintética del grupo hemo, conlleva a una sobreproducción y acumulación de porfirinas y de sus precursores PBG y 5-ALA, siendo el 5-ALA el causante de los síntomas neurovisceral del ataque agudo.

- **Tratamiento:**

Para el tratamiento de las porfirias agudas y para prevenir crisis futuras es esencial evitar en la medida de lo posible cualquier factor precipitante (metamizol, anticonceptivos orales, ayuno, estrés, entre otros).

Durante una crisis aguda el tratamiento consiste en la administración de hemina intravenosa, que aumenta la concentración de hemo hepático, inhibiendo la actividad de ALAS-1 y en consecuencia, la formación de precursores PBG y 5-ALA

Para el tratamiento sintomático es habitual administrar opiáceos, betabloqueantes, suero salino y antieméticos.

El fármaco Givosirán (Givlaari®), de reciente comercialización, se trata de un ARN interferente que actúa degradando el ARN mensajero que codifica para el enzima ALAS-1 en el hígado, disminuyendo, por tanto, la actividad enzimática al disminuir los niveles del enzima.

- **Seguimiento familiar:**

Tras el diagnóstico de una porfiria aguda es importante realizar un estudio familiar para identificar posibles portadores, a menudo asintomáticos. La detección de estos portadores permite realizar una serie de recomendaciones para evitar crisis (nombradas anteriormente), y la instauración del tratamiento específico de manera precoz en caso de presentar un ataque.

Nombre	Enzima afectada	Herencia
Porfiria eritropoyética congénita (P. Günther)	Uroporfirinógeno III-sintasa	AR
Porfiria cutánea tarda	Uroporfirinógeno-descarboxilasa	AD
Protoporfiria eritropoyética	Ferroquelatasa	AD
Protoporfiria ligada al cromosoma X	5-aminolevulinato sintasa 2	

Tabla 2. Porfirias cutáneas. Adaptado de: González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y biología molecular.

En el caso de los niños, es importante que se realicen el estudio genético tan pronto como sea posible con la finalidad de evitar ataques tras la pubertad.

PORFIRIAS CUTÁNEAS

Las porfirias cutáneas se caracterizan por la presentación de lesiones en la piel debido a la acumulación de las porfirinas en este órgano. (Tabla 2).

- **Manifestaciones clínicas:**

Las manifestaciones clínicas de las porfirias cutáneas son debidas a la estructura química de dobles enlaces de las porfirinas. La luz solar UV va a excitar a los electrones de las porfirinas acumuladas en la piel que promocionan a un estado triplete excitado que reacciona con el oxígeno molecular generando radicales libres que provocarán las lesiones dérmicas como enrojecimientos o ampollas. no corresponde esta figura a lo que indica). Además, es común que estos pacientes presenten un crecimiento anormal del pelo o hipertrichosis en las zonas expuestas a la luz UV.

- **Tratamiento:**

El único tratamiento eficaz para este tipo de porfirias es evitar la exposición a la luz solar en la medida de lo posible y en caso de exposición, tomar medidas para proteger la piel.

Además, existen tratamientos farmacológicos más específicos en función del tipo de porfiria cutánea.

ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LAS PORFIRAS

El estudio bioquímico de las porfirias está basado en el estudio de los diferentes compuestos acumulados siendo el patrón de excreción específico de cada tipo de porfiria.

Entre las diferentes pruebas que se pueden realizar está el test de Hoesch como prueba cualitativa rápida de precursores, la determinación cuantitativa de 5-ALA, PBG y porfirinas totales y fraccionadas en orina. Como pruebas de segunda línea, se encuentran la cuantificación de porfirinas fraccionadas en heces y sangre, la actividad enzimática eritrocitaria y el estudio molecular de los genes implicados.

- **Test de Hoesch:**

El test de Hoesch es una prueba cualitativa rápida, sencilla y barata que se realiza en orina de una micción que debe llegar a laboratorio protegida de la luz.

Este test permite la detección de un exceso de PBG en la orina del paciente. Para su realización, se añaden un par de

gotas de orina a 1 mL de reactivo de Erlich (4-dimetilaminobenzaldehído). Este reactivo reacciona con el anillo pirrólico del PBG dando lugar a un compuesto coloreado. (Figura 2). Si la orina vira a rosa, el test es positivo y se procede a congelar la muestra para continuar el estudio. Figura 3.

El test de Hoesch es positivo en crisis agudas de porfiria aguda intermitente, porfiria variegata y coproporfiria hereditaria.

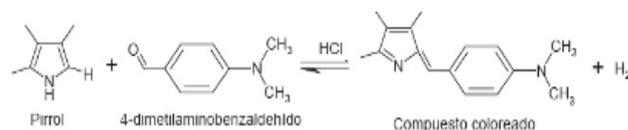


Figura 2. Reacción de Erlich. Tomada de: Segura N y col. 2018.

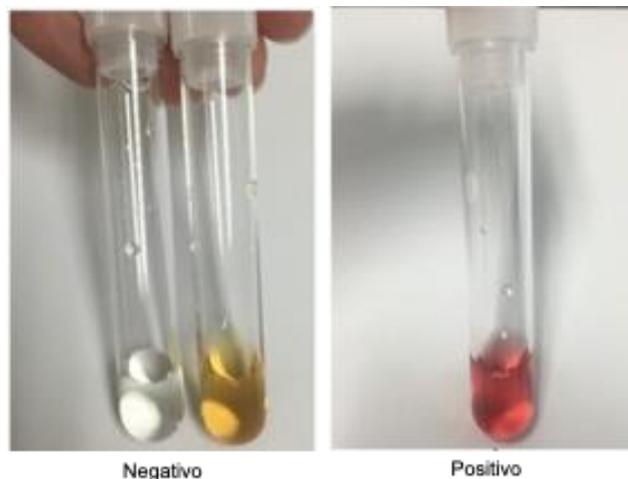


Figura 3. En la imagen de la izquierda, se observa, en el primer tubo, el reactivo de Erlich y en el segundo tubo, el reactivo de Erlich tras la adición de orina siendo el test negativo al no producirse un cambio de color. En la imagen de la derecha, se observa el viraje de la orina a color rosa, siendo el test de Hoesch positivo. Elaboración propia.

- **Cuantificación de precursores en orina:**

La cuantificación de los precursores 5-ALA y PBG es útil para el diagnóstico de porfirias agudas ya que se excretan de forma elevada durante las crisis, aunque pueden ser indetectables al cuantificarlos en una situación sin sintomatología.

La muestra empleada es la orina ya que son compuestos hidrosolubles y la técnica empleada para la cuantificación es la cromatografía en columnas de intercambio iónico y

posterior valoración colorimétrica tras adición de reactivo de Erlich y medición de absorbancia a 555 nm.

Unos valores de 5-ALA elevados pueden darse ante ataques agudos de porfiria aguda intermitente, porfiria variegata o coproporfiria hereditaria, aunque también pueden verse aumentados ante saturnismo o intoxicación por plomo. Sin embargo, unos valores de PBG aumentados podrían ser indicativo de un ataque agudo de porfiria.

- **Barrido fluorimétrico en plasma:**

El fundamento de esta técnica se basa en que las porfirias se excitan con luz UV a 405 nm y emiten fluorescencia en un rango de longitudes de onda que abarca desde los 550 nm a los 700 nm, dependiendo la longitud de onda máxima de emisión de las porfirinas acumuladas.

Un pico entre 634 y 636 nm es sugerente de protoporfiria eritropoyética, un pico entre 626 y 628 nm, lo es de porfiria variegata; mientras que si el pico se encuentra entre 619 y 621 nm orienta hacia porfiria cutánea tarda, coproporfiria hereditaria, porfiria aguda intermitente o porfiria de Günther. (Figuras 4 y 5).

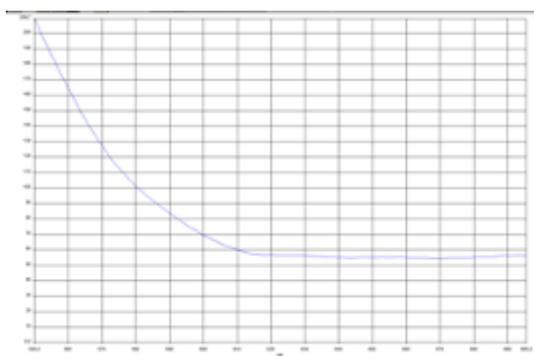


Figura 4. Barrido fluorimétrico negativo. Elaboración propia.

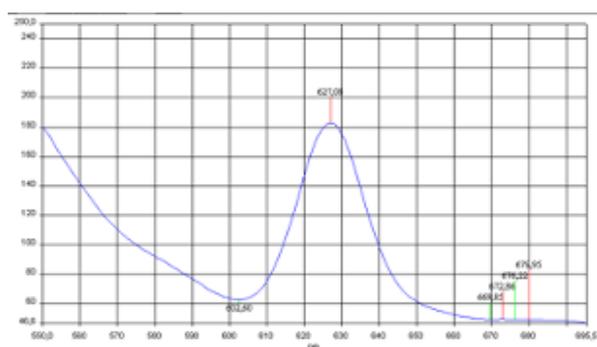


Figura 5. Ejemplo de barrido fluorimétrico donde se observa un pico de emisión a 627 nm sugerente de porfiria variegata. Elaboración propia.

- **Análisis de porfirinas totales y fraccionadas en orina:**

El análisis de porfirinas totales y fraccionadas en orina permite individualizar y cuantificar las diferentes porfirinas en función del grupo carboxílicos.

En primer lugar, se realiza un barrido espectrofotométrico para conocer de forma cualitativa la presencia o no de porfirinas en orina. Si el barrido es positivo, se separan y cuantifican las porfirinas por HPLC en fase reversa con detector de fluorescencia. Las porfirinas determinadas son (según el número de grupos carboxílicos que poseen), URO (I y III), hepta-, hexa-, penta-, COPRO (I y III). (Figura 6).

- **Análisis de porfirinas en heces:**

Para realizar el análisis de porfirinas en heces, en primer lugar, es necesario realizar una extracción con solventes. Posteriormente, se realiza espectrofotometría y cuantificación por HPLC con detector fluorimétrico. El patrón característico de una coproporfiria hereditaria es encontrar valores elevados de porfirinas a favor de la fracción COPRO III mientras que la porfiria variegata presentará valores elevados de la fracción PROTO. Sin embargo, la porfiria aguda intermitente tendrá valores normales de ambas fracciones y la porfiria cutánea tarda presentará elevación de isocoproporfinas.

- **Protoporfirina eritrocitaria:**

Para la cuantificación de protoporfirinas se emplea el método Pionelli y la posterior cuantificación fluorimétrica.

- **Zn-protoporfirina y protoporfirina libre:**

Los eritrocitos contienen protoporfirina libre y Zn-protoporfirina y el porcentaje de Zn-protoporfirina permite discernir entre protoporfiria eritropoyética y protoporfiria ligada al cromosoma X. Para determinar este porcentaje, se excita a una longitud de onda de 415 nm un hemolizado de hematíes en etanol, realizando un barrido de longitudes de onda de emisión entre los 550 y los 700 nm. La absorbancia máxima de la Zn-proto se encuentra a 590 nm mientras que la de la proto libre a 634 nm. Con la medida del área de estos picos se obtiene el porcentaje de cada una de las fracciones. (Figura 7).

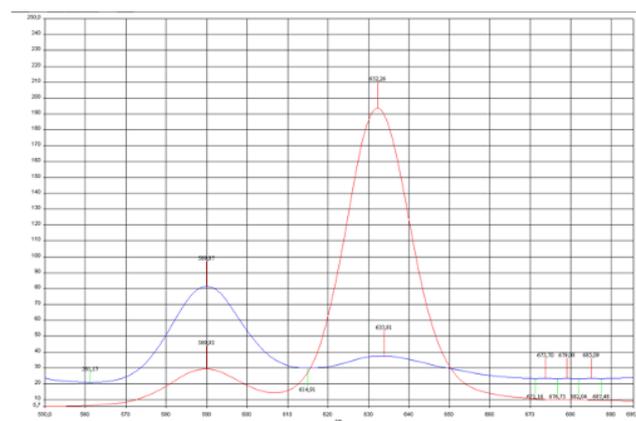


Figura 6. Barrido fluorimétrico de un hemolizado de hematíes de un paciente con protoporfiria eritropoyética. Elaboración propia.

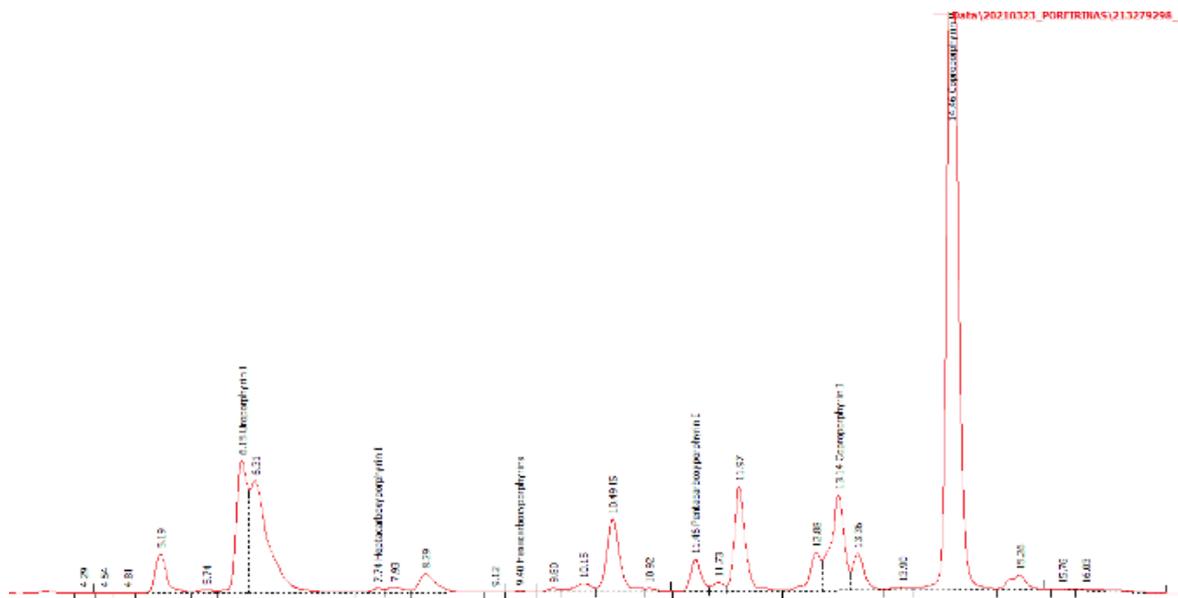


Figura 7. Patrón característico de coproporfiria hereditaria. Elaboración propia

ESTUDIO GENÉTICO DE LAS PORFIRIAS

El diagnóstico definitivo de la porfiria se alcanza con la secuenciación NGS por panel dirigido de los diferentes genes nucleares que codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de porfirinas y del grupo hemo. (Tabla 3).

Porfiria	Gen	Enzima codificada
Porfiria aguda intermitente	<i>HMBS</i>	HMB sintasa
Coproporfiria hereditaria	<i>CPOX</i>	Copro oxidasa
Porfiria variegata	<i>PPOX</i>	Proto oxidasa
Porfiria cutánea tarda	<i>UROD</i>	Uro descarboxilasa
Porfiria de Günther	<i>UROS</i>	Uro III sintasa
Deficiencia de PBG-sintasa	<i>ALAD</i>	PBG-sintasa
Protoporfiria eritropoyética	<i>FECH</i>	Ferroquelatasa

Tabla 3. Genes secuenciados en un panel de porfirias. Elaboración propia.

CONCLUSIÓN

El diagnóstico de porfiria es un proceso complejo que abarca desde la correcta anamnesis del paciente, la interpretación de los datos bioquímicos hasta la secuenciación de los genes implicados. (Tabla 4).

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Castellón Fernández FJ, y col. Protocolo de actuación en pacientes con sospecha de porfiria aguda. Rev Clin Esp. 2020.
- Badminton MN y col. Porphyrins and the Porphyrias. Tietz. 776-799.
- Macías Conde M y col. Síntesis y degradación del hemo. Porfiria. Hiperbilirrubinemia. En: Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 3ed.
- González A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 3º ed. Barcelona: Elsevier. 2019.

Porfiria	Enzima	Gen	Herencia	Manifestación	Parámetro aumentado			Pico de emisión en plasma
					Orina	Heces	Hematíes	
Deficiencia de PBG-sintasa	PBG-sintasa	<i>ALAD</i>	AR	Aguda	5-ALA		Zn-Proto	
Porfiria aguda intermitente	HMB sintasa	<i>HMBS</i>	AD	Aguda	5-ALA PBG			620 nm
Porfiria eritropoyética congénita (P. Günther)	Uro III sintasa	<i>UROS</i>	AR	Cutánea	URO I COPRO I	COPRO I	URO I COPRO I Zn-Proto	625 – 620 nm
Porfiria cutánea tarda	Uro descarboxilasa	<i>UROD</i>	AD	Cutánea	URO	Iso-COPRO		625 – 620 nm
Coproporfiria hereditaria	Copro oxidasa	<i>CPOX</i>	AD	Mixta	5-ALA PBG COPRO III	COPRO III		620 nm
Porfiria variegata	Proto oxidasa	<i>PPOX</i>	AD	Mixta	5-ALA PBG COPRO III	COPRO III PROTO IX		624-627 nm
Protoporfiria eritropoyética	Ferroquelarasa	<i>FECH</i>	AD	Cutánea		PROTO	PROTO (Zn-Proto 0-15%)	625-634 nm

Tabla 4. Cuadro resumen del diagnóstico diferencial de las porfirias. Elaboración propia.

ESTUDIO DEL LÍQUIDO ARTICULAR EN EL LABORATORIO CLÍNICO

Autor: María del Valle Romero Real, Laura Carrasco Parrón

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

Palabras clave: Líquido Sinovial, Diartrosis, Artrocentesis

INTRODUCCIÓN

El líquido sinovial se encuentra en las cavidades de las articulaciones móviles, también denominadas diartrosis como son las articulaciones que constituyen el hombro, el codo o la rodilla; a diferencia de las articulaciones inmóviles o sinartrosis, como la del cráneo, o semimóviles o anfiartrosis como la del pubis.

Las articulaciones móviles están revestidas por cartílago y separadas entre sí por una membrana que contiene el líquido sinovial, tal y como se observa en la Figura 1. Conjuntamente, cartílago y líquido sinovial, reducen la fricción entre los huesos durante el movimiento de la articulación. Además de proporcionar lubricación a las articulaciones, el líquido sinovial suministra los nutrientes al cartílago y disminuye el impacto de compresión de la articulación que se produce durante actividades como caminar o trotar.

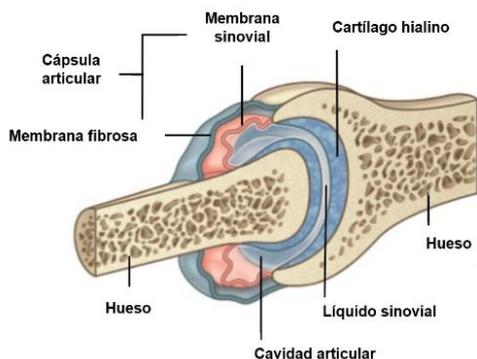


Figura 1. Características principales de una articulación sinovial. Adaptado de la referencia 10.

Este líquido se forma por ultrafiltración del plasma en la membrana sinovial. Esta filtración no es selectiva, de modo que su composición es similar a la del plasma, salvo por la exclusión de proteínas de elevado peso molecular. Además, está constituido por ácido hialurónico y una cantidad pequeña de proteínas secretadas por los sinoviocitos. Las moléculas de ácido hialurónico contribuyen a la viscosidad notable del líquido sinovial, siendo este un mucopolisacárido de elevado peso molecular que tiene como unidades estructurales de repetición al ácido glucurónico y a la N-acetil glucosamina, unidos por enlace glicosídicos $\beta(1 \rightarrow 3)$ y $\beta(1 \rightarrow 4)$.¹

OBTENCIÓN DE MUESTRA Y ASPECTO

• Indicación y obtención

El análisis del líquido sinovial es de utilidad manifiesta en las unidades de reumatología y ortopedia con el fin de orientar el diagnóstico en caso de artritis con diagnóstico incierto o sospecha de artritis séptica o infecciosa, de edema intraarticular o articular, de artritis inducida por cristales, de artritis aguda o gotosa, de traumatismo con edema articular o sospecha de hemofilia.^{2,3}

Asimismo, y junto con la historia clínica, la exploración y el estudio radiológico, el análisis del líquido articular desempeña un papel esencial en la evaluación y diagnóstico clínico de los pacientes atendidos en urgencias con sintomatología articular aguda.

A estas indicaciones diagnósticas se le une la terapéutica, dado que la extracción del fluido puede conllevar el alivio del dolor ocasionado por la distensión de la cápsula articular que tiene lugar en los derrames articulares. Su evacuación también puede mejorar los síntomas ocasionados por la artritis asociada a cristales o por la hemartrosis. En el caso de la artritis infecciosa, tanto la extracción del líquido como el lavado articular se hacen imprescindible durante los tres primeros días de evolución.

Para su evacuación, el líquido articular es aspirado con aguja en un procedimiento conocido como artrocentesis, realizado fundamentalmente en la articulación tibiofemoral o articulación de la rodilla, previa asepsia de la zona a puncionar y del material necesario. Sin embargo, cualquier otra articulación puede ser objeto de estudio.

Como resultado del procedimiento, se obtendrá el mayor volumen posible de líquido que se distribuirá en al menos tres contenedores estériles siendo cada uno ellos para recuento celular con anticoagulante EDTA-K3, bioquímica con anticoagulante de heparina de litio y para estudio microbiológico sin anticoagulante. En ocasiones puede ser requerido un tubo adicional para estudio citológico desde el servicio de anatomía patológica en aquellos casos de sospecha de proceso tumoral o enfermedad por depósito.⁴

• Aspecto del líquido articular en condiciones fisiológicas

En condiciones no patológicas, el volumen de líquido articular obtenido será de aproximadamente 3,5 mL y este presentará un color gradual entre incoloro a amarillo claro, de aspecto claro y viscosidad moderada debido a la polimerización del ácido hialurónico. Esto puede observarse

gracias al filamento que se forma al pipetear la muestra con una jeringa. Un filamento de 4 a 6 cm se considera dentro de los límites fisiológicos.³

ANÁLISIS DEL LÍQUIDO SINOVIAL

Un adecuado análisis del líquido sinovial debe incluir, en la mayoría de los casos, el recuento celular y diferencial, la observación de cristales, la determinación de los niveles de glucosa y proteínas, la tinción de Gram y Zhiel Neelsen y el cultivo en los medios adecuados.

Cuando la cantidad de líquido sinovial obtenida sea insuficiente, se deben priorizar los estudios en favor del recuento celular, el cultivo y la valoración de cristales.⁴

● Estudio macroscópico

Desde el punto de vista del análisis macroscópico, se puede recoger información acerca del color, claridad, volumen y viscosidad del líquido articular.

El volumen de líquido presentará variaciones en función de la articulación y de la cantidad acumulada. Por ejemplo, en la articulación tibiofemoral, la cantidad normal de líquido sinovial es de alrededor de 3,5 mL, pero puede incrementarse hasta unos 25 mL en un proceso inflamatorio. En algunos casos, por el contrario, sólo se pueden obtener algunas gotas, suficientes para un análisis microscópico o bacteriológico.

Como se indicaba previamente, el aspecto normal del líquido sinovial es claro y de color amarillo pálido. Sin embargo, en procesos inflamatorio adquiere un tono amarillo intenso y en los procesos sépticos, verdoso.

La turbidez, por su parte, se asocia fundamentalmente a la presencia de leucocitos, aunque la presencia de células sinoviales y fibrina también pueden ser las responsables de este aspecto y, los cristales, de presentar una apariencia lechosa.

La viscosidad del líquido sinovial se ve comprometida en procesos patológicos como la artritis, que afecta a la polimerización del hialurónico. Este grado de polimerización puede estimarse mediante la prueba de Ropes o coágulo de mucina. Al tratar el líquido con una disolución al 2-5% de ácido acético, se forma un coágulo rodeado de un líquido claro. A medida que la capacidad de polimerización del ácido hialurónico disminuye, el coágulo formado es menos consistente y el líquido circundante, de mayor turbidez. Esta prueba no se lleva a cabo en la práctica clínica diaria debido a que en todas las formas de artritis decrece la viscosidad del líquido sinovial, obteniéndose una pequeña información diagnóstica.⁵

● Estudio citológico

El líquido sinovial debe analizarse con la mayor celeridad posible tras la artrocentesis con el fin de evitar la lisis de las células. Este conteo puede llevarse a cabo manualmente o de manera automatizada.

- Metodología para el recuento de la celularidad

1. El recuento manual en cámara Neubauer, Burker u otra se realiza sobre la muestra original, en líquidos claros, o diluida con suero fisiológico, en líquidos turbios. Debe evitarse el uso

de disoluciones diluyentes que contengan ácido acético, ya que pueden precipitar el ácido hialurónico como un "coágulo de mucina" que atrapa los glóbulos blancos y altera el recuento resultante. Las disoluciones salinas de concentración 0,3%, por el contrario, son un diluyente apropiado para ocasionar el choque osmótico de los glóbulos rojos contaminantes y permitir el conteo leucocitario.

2. Recuentos automatizados. Los analizadores de sangre y orina han demostrado ser útiles para el recuento de células de otros fluidos corporales. Entre ellos se encuentra el analizador Unicel DxH que utiliza la tecnología Coulter basada en la impedancia. Su uso para líquido sinovial ha sido aprobado por la FDA y un estudio reciente confirmó la transferibilidad de los resultados de Unicel DxH 800 con la microscopía óptica.

- El conteo de hematíes se basa en el principio de medición del flujo de corriente continua. El analizador hace pasar la muestra, que previamente ha diluido en una disolución conductora de NaCl al 0,9%, a través de un orificio por el que circula una corriente eléctrica continua. A medida que cada eritrocito atraviesa el orificio, produce un aumento en la resistencia eléctrica que se traduce en una disminución de la corriente y la amplitud de este cambio es proporcional al tamaño de la célula. De este modo, cada célula queda registrada como un impulso eléctrico y el tamaño de la misma es evidenciado en la amplitud de cambio en la resistencia. Se obtienen así una gráfica en la que se representa el número de células contadas en el eje de ordenadas (Y) y la distribución por tamaño celular (fL) en el eje de abscisas (X).

- El conteo leucocitario se basa en el principio de medición de la citometría de flujo con un láser semiconductor, previa hemólisis de los glóbulos rojos con el tratamiento surfactante adecuado. El haz láser atraviesa cada una de las células, de modo que sus elementos formes producen alteración del haz resultante longitudinal y perpendicularmente al haz incidente. La luz dispersada en la dirección del haz incidente o Foward Scatter (FSC) releva información acerca del tamaño celular, de modo que cuanto mayor sea el tamaño de la célula, mayor será la penumbra originada, que será recogida por el detector situado tras la muestra. Por su parte, la dispersión de la luz lateral o Side Scatter (SSC) evidenciará la complejidad celular. Una mayor complejidad celular consecuencia de un mayor contenido de estructuras y orgánulos celulares ocasionará una mayor dispersión del haz incidente, que será registrado por un detector colocado en ángulo de 90° con respecto al haz incidente.

La información resultante queda recogida en mapas tridimensionales o scattergramas, como el que se muestra en la Figura 2, en los que se representa la abundancia relativa de células, el tamaño y la complejidad celular de las mismas.

El método de referencia en el análisis celular de los líquidos biológicos es el método manual en cámara citométrica de Neubauer, Burker u otra. Sin embargo, esta metodología es lenta, necesita de personal adecuadamente formado y no se

encuentra exento de la variabilidad interobservador, que puede dar lugar a errores. Es por ello por lo que la automatización del recuento celular ha ido ganando protagonismo al estandarizar el proceso, mejorar la precisión y simplificar el análisis.

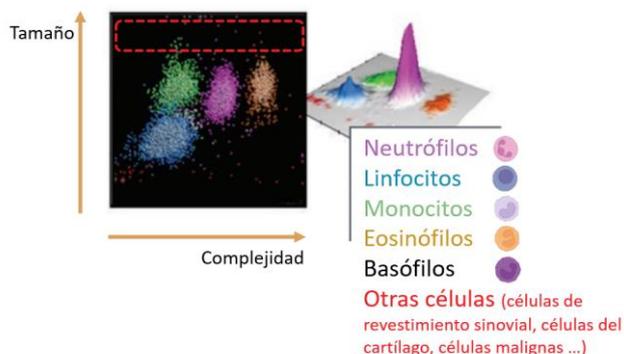


Figura 2. Diagrama de dispersión o scattergrama de poblaciones leucocitarias de líquido articular. Elaboración propia

A las ventajas ya mencionadas cabe adicionar que la incorporación de los contadores automatizados reduce el tiempo de respuesta, la exposición a riesgos biológicos y son efectivos con bajos límites de detección y cuantificación.^{6,7,8,9}

- Valores de referencia y situaciones patológicas

Los valores de referencia en la distribución leucocitaria del líquido articular son 7% de neutrófilos, 24% de linfocitos, 48% de monocitos, 10% de macrófagos y 4% de células de revestimiento sinovial. Alteraciones en esta distribución pueden ser sugestivas de proceso inflamatorio o séptico.

Las células de revestimiento sinovial, así como otras de gran tamaño quedan representadas en la parte superior del scattergrama debido a su mayor tamaño y complejidad y pueden aportar información acerca de un proceso de artritis reactiva, en el caso de las células LE ó las células de Reiter, o de la artritis reumatoide en el caso de observar rógocitos o células RA; no así en el caso de la presencia de células de revestimiento, quienes pueden hallarse en líquidos articulares no patológicos.

Asimismo, la revisión de células de elevado tamaño y complejidad debe hacer sospechar de la presencia de células neoplásicas caracterizadas morfológicamente por tamaño celular polimorfo con formas muy grandes, núcleos de tamaño y configuración distintos, elevada relación núcleo-citoplasma, intensa basofilia, agrupación celular no delimitada, nucleolos de gran tamaño y figuras mitóticas, en la tinción. Se hace por ello conveniente realizar, en caso de sospecha de células neoplásicas, la tinción de una preparación de la muestra con Wright-Giemsa con el fin de llevar a cabo la revisión al microscopio de la naturaleza celular, pudiendo ser una herramienta de importancia en la orientación diagnóstica.¹

- Empleo de hialuronidasa en el conteo celular

Uno de los inconvenientes que puede presentar el análisis automatizado del líquido sinovial es consecuencia de la

presencia de ácido hialurónico. Este mucopolisacárido aumenta la viscosidad del líquido, pudiendo obstruir la celda de flujo y ocasionar un inadecuado funcionamiento del analizador.

En estas situaciones, cabe contemplar el tratamiento del líquido de características viscosas con hialuronidasa, una endoglicosidasa que hidroliza este mucopolisacárido por rotura de los enlaces glicosídicos, facilitando así el estudio al conseguir disminuir la viscosidad.¹⁰

En el estudio realizado por Froom *et al.*, en el que se compara el conteo de células nucleadas en líquido sinovial de forma manual y en un analizador automático en ausencia y presencia de hialuronidasa, se pone de manifiesto la infraestimación en el número de leucocitos cuando no se utiliza la enzima, lo cual haría, en algunos casos, que no se distinguiese una artritis séptica de otra que no lo fuese. De ahí, la importancia en el correcto tratamiento de la muestra en función de sus características físicas.¹¹

Uno de los protocolos descritos en la literatura científica para el pretratamiento de las muestras de líquido articular de naturaleza viscosa consiste en transferir un volumen de 1mL de muestra a un tubo de ensayo que contiene hialuronidasa. Tras incubación a 37°C durante 30 min y 10 min de centrifugación a 931g, se procede a realizar su análisis manual o automatizado.¹²

● Identificación de cristales

La presencia de cristales en el líquido sinovial es importante en el diagnóstico y evaluación de la artritis. Esto es debido a que la formación de cristales en una articulación con frecuencia produce inflamación aguda y dolor y esto puede convertirse en un proceso crónico.

Las causas de formación de cristales incluyen trastornos metabólicos, disminución en la excreción renal de sustancias químicas que se acumulan y cristalizan y las inyecciones medicamentosas en la articulación.

El examen de los cristales debe realizarse tras la recolección del líquido, ya que estos pueden sufrir alteraciones con los cambios de pH y temperatura. Además, es necesario evitar la degradación celular ya que los cristales pueden localizarse tanto intracelular como extracelularmente. Por ello, es importante que su observación se lleve a cabo sobre la muestra en un contenedor sin anticoagulantes y sin que esta se haya refrigerado durante períodos prolongados o congelado.

La identificación de los cristales se lleva a cabo de acuerdo a su morfología y birrefringencia. La primera de las características puede valorarse con un microscopio de luz ordinaria. Sin embargo, el estudio de la birrefringencia debe realizarse empleando un microscopio de luz polarizada, normalmente acompañado de un compensador rojo de primer orden.^{10,13}

- Observación de cristales en microscopio de luz polarizada

La presencia en el líquido articular de cristales birrefringentes hace necesario el empleo del microscopio de luz polarizada. Son birrefringentes aquellos cristales que tienen un índice de refracción que depende de la dirección de propagación de la

luz. Para estudiar esta propiedad óptica, se requiere de un microscopio con dos filtros polarizadores. La característica principal de estos elementos es que filtran la luz polarizada lineal, que oscila en una sola dirección. El primer filtro se llama polarizador y se coloca entre la fuente luminosa del microscopio y la muestra. El segundo filtro se llama analizador y se coloca entre la muestra y los oculares del microscopio. Una vez que el analizador y el polarizador están alineados perpendicularmente, se produce un fondo oscuro y cualquier estructura birrefringente se muestra con características brillantes o coloridas en este fondo oscuro. Generalmente, se utiliza un compensador rojo para eliminar la luz verde de modo que el fondo se observa rosa, en vez de negro oscuro.

Cuando un cristal genera un plano de luz paralelo al del compensador, se observa de color azul y se dice que tiene elongación positiva. Si, por el contrario, se orienta perpendicular al plano del analizador, se observará amarillo (elongación negativa).

- Cristales más frecuentes

Los principales tipos de cristales que pueden observarse en líquido articular son el urato monosódico y el pirofosfato cálcico dihidratado.

1. Urato monosódico

Los cristales de urato monosódico aparecen como formas de aguja o, menos frecuentemente, como esferulitos redondeados que pueden localizarse tanto intra como extracelularmente. Estos cristales presentan una fuerte birrefringencia negativa, se manifiestan en caso de gota y son consecuencia de la alteración en el metabolismo de las purinas, elevado consumo de purinas en dieta o disminución en la excreción renal de ácido úrico.

2. Pirofosfato cálcico

Los cristales de pirofosfato cálcico tienen aspecto romboidal y se presentan cuando existen elevados niveles de calcio y pirofosfato en el cartilago. Estos cristales presentan una débil birrefringencia negativa y se asocian a pseudogota, de sintomatología similar a la gota y cuyos factores de riesgo incluyen la edad, traumatismos, desequilibrio hidroeléctrico y otras patologías relacionadas con las glándulas tiroideas.

- Otros cristales

Otros cristales que pueden visualizarse en el estudio del líquido articular son los cristales de colesterol, corticosteroides, oxalato cálcico o hidroxapatita:

- 1. Cristales de colesterol:** se evidencian como placas romboidales con muescas y de birrefringencia negativa en aquellos líquidos articulares inflamatorios o asociados a procesos reumatoides, de pacientes con lupus eritematoso o con espondiloartropatías.
- 2. Cristales de corticosteroides:** se muestran como placas planas de forma variable, con birrefringencia positiva o negativa. Se manifiestan en pacientes a los que se les ha administrado corticoides de forma intraarticular, previamente y pueden persistir hasta un mes tras la inyección.

- 3. Cristales de oxalato cálcico:** son cristales en forma de sobre, con birrefringencia negativa y se suelen encontrar en pacientes con artropatía asociada a diálisis renal crónica o en casos de oxalosis primaria, un error innato del metabolismo.
- 4. Cristales de hidroxapatita:** son partículas pequeñas sin birrefringencia, por lo que son difíciles de observar a menos que se encuentren agrupados. Aparecen en algunas artritis y su presencia se asocia con inflamación sintomática aguda.
- 5. Cristales de hematoïdina.** Estos cristales se forman como consecuencia de la degradación de la hemoglobina y se pueden detectar en pacientes con hemartrosis. Morfológicamente, son de forma romboïde o rectangular y birrefringencia positiva o negativa. Debido a la posibilidad de confundirlos con cristales de hematoïdina, es necesario visualizarlos en el microscopio óptico, donde se manifiestan de color café u oro.

Otros cristales aún más inusuales son los cristales de Charcot-Leyden. Estos están constiuidos por lisofosfolipasa o fosfolipasa B, presentan forma de puro, birrefringencia positiva o negativa y pueden evidenciarse en pacientes con sinovitis eosinofílica asociada a vasculitis.^{13,14}

En la Figura 3 se recogen algunos de los cristales que pueden hallarse en el estudio microscópico del líquido sinovial.

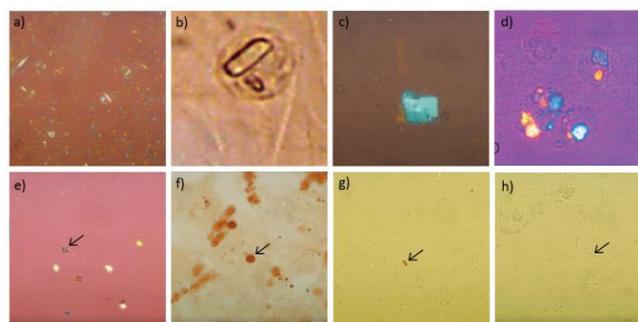


Figura 3. Cristales de relevancia en líquido articular. a)

Urato monosódico extracelular, microscopio de luz polarizada x200. b) Pirofosfato cálcico, microscopio de luz polarizada. c) Cristales de colesterol en preparación de gota gruesa, microscopio de luz polarizada x200. d) Cristales de corticosteroides, microscopio de luz polarizada x100. e) Cristales de oxalato cálcico, microscopio de luz polarizada x400. f) Cristales de hidroxapatita de calcio teñidos con rojo de alizarina, microscopio de luz visible, x400. g) Cristales de hematoïdina, microscopio de luz polarizada x400. h) Cristal de Charcot-Leyden, microscopio de luz visible x400.

Adaptado de la referencia 13 y 15.

● Estudio bioquímico

Al ser un ultrafiltrado del plasma, el líquido sinovial presenta resultados de los parámetros bioquímicos similares a los séricos. Consecuentemente, pocas pruebas son de importancia en el área clínica, siendo los más solicitados los niveles de glucosa y proteínas.

Los niveles de glucosa suelen ser unos 10 mg/dL inferior a la glucosa plasmática y decrecen significativamente en los desórdenes inflamatorios y sépticos. Es por ello importante determinar simultáneamente los niveles en líquido articular y plasma.

Por su parte, los niveles de proteínas son inferiores a 3 g/dL, lo que constituye aproximadamente un tercio de las proteínas plasmáticas. Esto es consecuencia de que las moléculas de elevado peso molecular no son filtradas a través de las membranas sinoviales. Este nivel proteico en líquido se ve incrementado en los procesos inflamatorios y hemorrágicos, aunque su medición a nivel individual no permite la clasificación de estos desórdenes.

Otros parámetros que pueden completar el estudio bioquímico del líquido sinovial son el lactato y el ácido úrico. El primero de ellos proporciona una rápida diferenciación de un proceso inflamatorio de uno séptico, elevándose en los procesos infecciosos por encima de 250 mg/dL. Por su parte, la determinación de ácido úrico puede ser sustitutivo en el apoyo al diagnóstico de gota en aquellos casos en los que no sea posible demostrar la presencia de cristales de urato monosódico.⁴

- **Estudio microbiológico**

En condiciones no patológicas, hay ausencia de microorganismos en el líquido sinovial. Sin embargo, ante la sospecha de un proceso séptico, el líquido articular será susceptible de estudio microbiológico. Este incluirá la tinción de Gram, menos frecuentemente de Ziehl Neelsen, y los cultivos correspondientes.

La tinción de Gram permite la observación directa de bacterias y hongos al microscopio óptico. Este estudio es sencillo y de gran utilidad en el diagnóstico de la artritis séptica.

Por su parte, la tinción de Ziehl Neelsen, solicitada con menos frecuencia, se utiliza ante la sospecha de bacilos ácido-alcohol resistentes como el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Generalmente, los resultados de la tinción son negativos dado que su sensibilidad se encuentra en torno al 2% y el cultivo, la histopatología o las técnicas moleculares para micobacterias son más recomendables en el diagnóstico de la artritis tuberculosa.

Por su parte, el cultivo y antibiograma permiten aislar e identificar al microorganismo responsable, con el fin de establecer un tratamiento antimicrobiano eficaz. Los patógenos articulares más frecuentes son *Neisserias*, estafilococos, estreptococos y Gram negativos. Un cultivo estéril no descarta completamente la infección ya que el inóculo bacteriano puede ser insuficiente o su crecimiento puede estar inhibido por un tratamiento previo. Es por ello por lo que se aconseja discontinuar el uso de antibióticos al menos 24 horas antes de la obtención del líquido articular. En cualquier caso, un resultado estéril ante una sospecha séptica debe alertar de la presencia de otros microorganismos que no crecen en los medios habituales y necesitarían de enriquecimientos selectivos como gonococo, hongos, espiroquetas, treponemas o micobacterias.^{3,14}

TIPOS DE LÍQUIDO SINOVIOL Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis del líquido articular, es posible realizar una clasificación del mismo en diferentes grupos que permiten ayudar al diagnóstico diferencial. Estos son líquido sinovial normal, no inflamatorio, inflamatorio moderado, inflamatorio intenso, infeccioso y hemorrágico y quedan recogidos en la Tabla 1. Cada una de estas categorías de líquidos patológicos guarda relación con determinados diagnósticos diferenciales.

El líquido articular no inflamatorio se caracteriza por un color amarillo de aspecto claro y elevada viscosidad. Su recuento celular suele presentar una concentración leucocitaria inferior a 2000 glóbulos blancos por mm³, siendo un 25% de ellos polimorfonucleares. A nivel bioquímico, muestra valores de glucosa que suponen un 10% con respecto a los niveles plasmáticos (cociente líquido/sangre 0,8-1,0) y proteínas de 2 g/dL. Este líquido, libre de cristales y sin alteraciones en el estudio microbiológico, puede ser presuntivo de artrosis, trauma, osteocondritis, artritis reumatoide precoz, necrosis aséptica, sinovitis cristalina intercrisis, amiloidosis, osteopatía hipertrófica o enfermedades por depósito.

En siguiente lugar, el líquido sinovial de características inflamatorias puede clasificarse como inflamatorio moderado o intenso.

En el primero de los casos, el fluido presenta un aspecto amarillento turbio de baja viscosidad y recuento leucocitario de 5000 a 30000 células por mm³, con predominio mononuclear. A nivel bioquímico, se caracteriza por niveles aumentados de glucosa y proteína y presencia de lactato. Este líquido estéril y sin cristales puede orientar a un proceso de artritis reumatoide, síndrome de Reiter o colagenosis.

Por su parte, el líquido inflamatorio intenso presenta un color de amarillo a lechoso, es opaco y turbio y presenta muy baja viscosidad. En el conteo celular destaca entre 20000 a 80000 leucocitos por mm³, siendo más del 60% polimorfonucleares. Los parámetros bioquímicos son análogos a aquellos descritos para el líquido inflamatorio moderado. Adicionalmente, puede evidenciarse en él la presencia de cristales, asociándose este hallazgo a gota o pseudogota.

El líquido de características séptica es purulento, opaco y de muy baja densidad. En este caso, hasta el 95% de los leucocitos son polimorfonucleares, siendo su conteo total desde 50.000 a más de 100.000 por mm³. Destaca los elevados niveles de lactato, niveles aumentados de proteínas (> 3,5 g/dL) y disminuidos de glucosa (> 50% inferior a la plasmática), que pone de manifiesto la presencia microorganismos bacterianos (artritis séptica o tuberculosa)

En último lugar, un líquido articular de naturaleza hemorrágica puede ser indicativo de trauma, nefropatía, discrasia sanguínea, tratamiento anticoagulante, prótesis articular, tumores primarios y metastásicos, leucemia y sinovitis vellonodular.

Tipo de líquido	Hallazgos de laboratorio	Patologías asociadas
Normal	<p>Color amarillo y aspecto claro</p> <p>Viscosidad elevada</p> <p>< 200 leucocitos/mm³ (25% PMN)</p> <p>Glucosa 10% de la sanguínea (glucosa sinovial/glucosa sanguínea 0,8-1,0)</p> <p>Proteínas 2g/dL</p>	-
No inflamatorio	<p>Color amarillo y aspecto claro</p> <p>Viscosidad elevada</p> <p>< 2000 leucocitos/mm³ (25% PMN)</p> <p>Glucosa 10% de la sanguínea (glucosa sinovial/glucosa sanguínea 0,8-1,0)</p> <p>Proteínas 2g/dL</p>	<p>Trastornos articulares degenerativos, artrosis, trauma, osteocondritis, AR precoz, necrosis aséptica, sinovitis cristalina intercrisis, amiloidosis, otepatía hipertrófica, enfermedades por depósito.</p>
Inflamatorio moderado (origen inmunitario)	<p>Color amarillo y aspecto turbio</p> <p>Viscosidad disminuida</p> <p>5000-30000 leucocitos/mm³ (< 50-60% con predominio mononuclear)</p> <p>Presencia de bajos niveles de lactato</p> <p>Glucosa 20-25% inferior de la sanguínea (glucosa sinovial/glucosa sanguínea 0,5-0,8)</p> <p>Proteínas 2,5-3,5 g/dL</p>	<p>Artritis reumatoide, reumatismo palindrómico, síndrome de Reiter, espondiloartritis, artritis víricas, colagenosis, microcristalinas (gota, pseudogota), fiebre reumática, vasculitis, policondritis recidivante, fiebre mediterránea familiar, enfermedad de Brechet, paniculitis, sarcoidosis.</p>
Inflamatorio intenso (inducido por cristales)	<p>Color amarillo a lechoso y aspecto muy turbio, opaco</p> <p>Viscosidad muy disminuida</p> <p>20000-80000 leucocitos/mm³ (> 60%, en torno al 90%)</p> <p>Presencia de bajos niveles de lactato</p> <p>Glucosa 20-25% inferior de la sanguínea (glucosa sinovial/glucosa sanguínea 0,5-0,8)</p> <p>Proteínas 2,5-3,5 g/dL</p> <p>Presencia de cristales</p>	<p>Artritis reumatoide, reumatismo palindrómico, síndrome de Reiter, espondiloartritis, artritis víricas, colagenosis, microcristalinas (gota, pseudogota), fiebre reumática, vasculitis, policondritis recidivante, fiebre mediterránea familiar, enfermedad de Brechet, paniculitis, sarcoidosis.</p>
Infeccioso	<p>Color amarillo purulento y aspecto opaco</p> <p>Viscosidad disminuida</p> <p>50000 a >100000 leucocitos/mm³ (75-100%, en torno al 95%)</p> <p>Presencia de elevados niveles de lactato</p> <p>Glucosa >50% inferior de la sanguínea (glucosa sinovial/glucosa sanguínea <0,5)</p> <p>Proteínas >3,5 g/dL</p> <p>Gram y/o cultivo positivo</p>	<p>Infección microbiana (bacteriana, tuberculosa)</p>
Hemorrágico	<p>Color rojizo y aspecto xantocrómico</p> <p>Viscosidad variable</p> <p>200-10000 leucocitos/mm³ (<50% PMN)</p>	<p>Lesión traumática, neuroartropatía, discrasia sanguínea, tratamiento anticoagulante, prótesis articular, tumores primarios y metastásicos, leucemia, sinovitis vellonodular</p>

Tabla 1. Diagnóstico diferencial según el tipo de líquido articular. Adaptado de la referencia 4.

CONCLUSIONES

El análisis del líquido articular es una herramienta de ayuda en el diagnóstico y tratamiento de las artropatías. Actualmente, hay muchas herramientas disponibles para diagnosticar pacientes con trastornos reumatológicos, incluidos nuevos marcadores e imágenes avanzadas. Sin embargo, el análisis del líquido sinovial sigue siendo la prueba "*gold standard*" al proporcionar información útil acerca del grado de inflamación y el tipo de compromiso celular, para el diagnóstico de artritis inducida por cristales y séptica.

De este modo, aunque el diagnóstico de enfermedades reumatológicas a menudo es un desafío en sus primeras etapas, el estudio del líquido articular en el laboratorio clínico contribuye notablemente en el camino hasta encontrar el diagnóstico adecuado.¹⁶

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Graff. Análisis de orina y de los líquidos corporales. 2ª edición. Panamericana; 2011
2. González Hernández, A. Estudio de líquidos biológicos. En: Álvaro González Hernández. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 3ª edición. Barcelona. Elsevier; 2019. [203-204]
3. Ruiz Reyes, G; Ruiz Argüelles A. Líquidos orgánicos. Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio. 3ª edición. Panamericana; 2017. [115-116]
4. Vidal Fuentes, J. Indicaciones de la artrocentesis y análisis del líquido sinovial. Medicine. Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. 2005. 9;(28): 1849-1851
5. Gómez Lagos, R et al. Recomendaciones para el análisis de líquidos biológicos. Instituto de Salud pública de Chile. 2016
6. Alcaide Martín, MJ, Altimira Queral, L, Sahuquillo F et al. Automated cell count in body fluids: a review. Advances in Laboratory Medicine. 2021. 2(2):149-161.
7. Cho, J; Oh, J; Lee, S et al. Performance Evaluation of Body Fluid Cellular Analysis Using the Beckman Coulter UniCel DxH 800, Sysmex XN-350, and UF-5000 Automated Cellular Analyzers. Ann Lab Med. 2020. 40(2):122-130
8. El principio de Coulter (1954-1955) [internet]. Beckman Coulter Life Sciences. [citado 26 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.beckman.mx/resources/technologies/flow-cytometry/history/coulter-principle>
9. Electrical impedance methodology. [internet]. Abott. [citado 26 de julio de 2023]. Disponible en: <https://hematologyacademy.com/hematologymethod/electrical-impedance-methodology/>
10. Cebreiros López, I. Líquidos biológicos. Asociación española de Laboratorio clínico. Mooc Labclin. 2023.
11. Froom P. Automated Evaluation of Synovial and Ascitic Fluids With the Advia 2120 Hematology Analyzer, *American Journal of Clinical Pathology*. 2013. 140(6);828–830.
12. Brouwers H, Hendrick von Hegedus J, van der Linden E et al. Hyaluronidase treatment of synovial fluid is required for accurate detection of inflammatory cells and soluble mediators. *Arthritis Research & Therapy*. 2022. 24(18).
13. Martínez-Castillo A, Núñez C, Cabiedes J. Análisis del líquido sinovial. *Reumatología clínica*. 2010; 6(6): 316-321.
14. Análisis del líquido sinovial [internet]. Lab test online (SEQC-ML). [citado el 26 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.labtestsonline.es/tests/analisis-del-liquido-sinovial>.
15. Selvi E, De Stefano R, Lorenzini S et al. Arthritis Induced by Corticosteroid Crystals. *The journal of Rheumatology*. 2004. 31:3.
16. Oliviero F, Mandell B. Synovial fluid analysis: Relevance for daily clinical practice, Best Practice & Research Clinical Rheumatology. 2023. 101848. In Press, Corrected Proof.

ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS

Autor: Raquel Victoria Melgares de Aguilar Marco, Irene González Martínez

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

Palabras clave: Metabolismo, Lípidos, Dislipemias

LÍPIDOS

Los lípidos son un grupo de moléculas muy heterogéneo que tienen como principal característica el ser insolubles en medios acuosos. Proviene de la síntesis en el propio organismo y de los alimentos ingeridos a través de la dieta.

Estas moléculas presentan funciones básicas como: formar parte de las membranas celulares, ser precursores de hormonas y ácidos biliares, ayudar en la digestión de alimentos y servir como fuente de energía.

Debido a su naturaleza hidrofóbica son insolubles en el medio acuoso plasmático y necesitan de un sistema de transporte para ser distribuidos correctamente dentro del organismo, las lipoproteínas son las partículas encargadas de esta función.

En base a su organización funcionales se puede clasificar a los lípidos en diferentes categorías: lípidos de almacenamiento energético, lípidos estructurales de membrana y lípidos que actúan como señales y cofactores.

LÍPIDOS PLASMÁTICOS

Dentro de los diferentes tipos de lípidos podemos encontrar algunos principalmente a nivel plasmáticos:

- **Ácidos grasos.**

Son lípidos simples considerados estructuralmente como cadenas hidrocarbonadas de diferentes longitudes con ácidos carboxílicos en su extremo. Se clasifican en función de la longitud de la cadena y de la presencia o ausencia de dobles enlaces y del número de estos que contienen. Se denominan ácidos grasos saturados (palmítico, esteárico, láurico, mirístico, etc) cuando la molécula no presenta dobles enlaces. Por otro lado, se consideran insaturados si presentan en su estructura dobles enlaces, además dentro de estos podremos encontrar monoinsaturados y poliinsaturados en función del número de dobles enlaces que contengan.

En sangre se transportan unidos a albúmina o esterificados formando parte de lípidos más complejos dentro de la estructura de las lipoproteínas.

Los ácidos grasos insaturados pueden clasificarse como omega 3 u omega 6 en función de la presencia de un doble enlace respecto al grupo carboxílico terminal de cadena. Son omega 3 cuando el doble enlace está presente en el tercer carbono desde el extremo carboxiterminal de la molécula y omega 6 cuando es en el carbono 6 respecto al extremo carboxiterminal.

Los ácidos grasos insaturados pueden clasificarse también en función de la configuración espacial que presenten sus dobles enlaces, denominándose cis o trans.

- Síntesis:

Proviene de la síntesis a nivel hepático, que se produce a partir de acetil-CoA, malonil-CoA y el complejo ácido graso sintasa. Algunos ácidos grasos no pueden ser sintetizados endógenamente a través de esta vía, son los denominados ácidos grasos esenciales y son el ácido linoleico y linolénico.

- Degradación:

Consiste en la oxidación de la molécula hasta acetil-CoA y se produce en todos los tejidos, pero especialmente a nivel del hígado, concretamente en la matriz mitocondrial de los hepatocitos.

El ácido graso debe ser activado en el citosol previamente para poder acceder al compartimento de la matriz mitocondrial a través de lanzaderas. El principal proceso de oxidación que se produce es la β -oxidación, en la cuál participan diferentes enzimas en función del tipo de ácido graso a degradar, pues la presencia de dobles enlaces o longitud mayor de la cadena hidrocarbonada implica la intervención de enzimas diferentes. A nivel de otros orgánulos, como los peroxisomas, se produce también la degradación de las moléculas de ácidos grasos mediante β o α -oxidación. Por otro lado, también se produce una ω -oxidación.

El resultado de la β -oxidación es la producción de acetil-CoA y las coenzimas $FADH_2$ y $NADH$ que aportan electrones que entran a la ruta de fosforilación oxidativa mitocondrial. El acetil-CoA puede entrar directamente en el ciclo de Krebs o de los ácidos tricarbóxicos para producir energía en forma de ATP o participar en otros procesos metabólicos como la gluconeogénesis, ureagénesis o cetogénesis. En la cetogénesis, a partir de acetil-CoA se forman los cuerpos cetónicos que se exportan a tejidos como el cerebro en los que constituyen un importante combustible auxiliar alternativo a la glucosa en períodos de ayuno prolongado.

Debido a la gran cantidad de enzimas implicadas en el proceso de degradación de los ácidos grasos pueden producir alteraciones, principalmente de tipo autosómico recesivo, a diferentes niveles del proceso que afecten al transporte de la molécula a la mitocondria o a su degradación a nivel de la matriz mitocondrial. Además, el déficit de coenzimas como la FAD por alteraciones del metabolismo de la vitamina B2, de la que procede, también afecta a esta ruta.

Las principales alteraciones que se dan a este nivel son:

1. Deficiencia de acil-CoA-deshidrogenasa de cadena media (MCAD).
2. Deficiencia de 3-hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa de cadena larga (LCHAD).
3. Deficiencia de acil-CoA-deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD).
4. Deficiencia de carnitina-palmitoiltransferasa (CPT-II).

El resultado de estas alteraciones es una disminución de la capacidad de obtención de energía a partir de la degradación de los ácidos grasos, acumulación de ácidos grasos libres, descenso de los niveles de acetil-CoA (que produce hiperamonemia, hipocetonemia, hipoglucemia, etc). La disminución de la β -oxidación a nivel de la mitocondria produce un aumento de la oxidación de los ácidos grasos a nivel de los peroxisomas, produciendo una acumulación de ácidos dicarboxílicos que son los productos finales de la ruta.

Entre las manifestaciones clínicas de estas alteraciones encontramos: hepatomegalia por acumulación de lípidos, miopatía esquelética con hipotonía, dolor muscular, rabdomiólisis, miocardiopatía con arritmias o hipertrofia y alteraciones neurológicas, letargia, coma e incluso muerte debido a los estados de hipoglucemia y al efecto tóxico de los ácidos grasos orgánicos que se acumulan.

En relación con el diagnóstico bioquímico de estas alteraciones, es útil la medición de acilcarnitinas (resultantes de la reacción entre acil-CoA en exceso y carnitina libre), medición de la glucemia (hipoglucemia hipocetósica), y se observa elevación de amoníaco, lactato y aminotransferasas. Las lesiones musculares además producen un incremento sérico de CK, aldolasa y mioglobulinuria. Los ácidos grasos libres en plasma y de ácidos dicarboxílicos en orina se elevan.

El análisis genético del gen sospechoso o paneles de genes implicados en la β -oxidación, es también de utilidad. En el caso de la MCAD, LCHAD, VLCAD y deficiencia primaria de carnitina son enfermedades incluidas en el programa de cribado neonatal de la Comunidad de Madrid.

- **Colesterol.**

El colesterol plasmático procede tanto de la absorción intestinal (dieta, bilis y descamación intestinal) como de la síntesis endógena. Es un esteroide, moléculas presentes en la mayoría de las membranas de células eucariotas que presentan un núcleo esteroide formado por cuatro anillos fusionados (ciclopentanoperhidrofenantreno) con otros grupos funcionales: grupo de cabeza polar (hidroxilo en el carbono 3) y una cadena hidrocarbonada en el carbono 17.

La molécula de colesterol es precursora de hormonas esteroideas (mineralocorticoides y glucocorticoides), hormonas sexuales (progestágenos, estrógenos y andrógenos) y vitaminas. La mayoría de los tejidos presentan la capacidad de síntesis de colesterol, aunque ésta se produce principalmente en el citoplasma de los hepatocitos.

En plasma, el colesterol se puede encontrar en forma libre o esterificada a uno o varios ácidos grasos de cadena larga a través del grupo polar del carbono 3. Esta esterificación permite reducir la polaridad de la molécula y los ésteres de colesterol pasan a ser insolubles en agua, pero solubles en el núcleo de las lipoproteínas.

- **Triglicéridos.**

Son lípidos de almacenamiento energético y se consideran estructuras complejas, pues están formados por tres moléculas iguales o distintas de ácidos grasos esterificados con una molécula de glicerol.

Se denominan triglicéridos simples si presentan el mismo ácido graso esterificado y complejos si son diferentes. La mayoría de los ácidos grasos obtenidos a través de la dieta son complejos y contienen ácidos grasos de cadena larga.

Se consideran la principal fuente de lípidos de la dieta y son tanto de origen vegetal como animal. Circulan en el organismo como componentes de las lipoproteínas plasmáticas, concretamente en quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

Se almacenan formando grandes gotas de lípidos en el tejido adiposo y son hidrolizados para liberar moléculas de ácidos grasos libres que sirven como fuente de energía.

- **Fosfolípidos.**

Están formados por un esqueleto de glicerol al que se unen dos ácidos grasos y un grupo fosfato. El grupo fosfato se esterifica a su vez con un grupo hidroxilo de alguna molécula hidrofílica como la colina, etanolamina o serina (glicerofosfolípidos).

Son los lípidos complejos más hidrofílicos y su combinación de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas hace que sean componentes ideales para las membranas y que formen parte de la superficie de las lipoproteínas.

Los dos principales fosfolípidos son la lecitina (fosfatidilcolina) y la esfingomielina (esfingofosfolípido con grupo polar fosfocolina).

La síntesis de los fosfolípidos se lleva a cabo de manera endógena principalmente, en el hígado, aunque su síntesis puede tener lugar en casi todos los tejidos. En ella se producirá la activación de un armazón de glicerol al que se unirán los ácidos grasos y un grupo de cabeza hidrofílico.

TRANSPORTE DE LÍPIDOS Y METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS

Los lípidos en el organismo se encuentran en continuo intercambio y tienen que ser trasladados desde los lugares de absorción y síntesis a los lugares de depósito y uso. Al ser insolubles en el medio acuoso interno, necesitan de estructuras que colaboren en su transporte.

Por ello, los ácidos grasos libres circulan en el medio plasmático unidos a la proteína albúmina y el resto de los lípidos se unen a proteínas denominadas apolipoproteínas

para formar complejos lipoproteicos solubles, las lipoproteínas.

- **Lipoproteínas plasmáticas.**

Son estructuras esféricas que presentan una parte central hidrofóbica rodeada de una capa hidrofílica. En la parte interna hidrofóbica, se encuentra el colesterol esterificado y los triglicéridos, mientras que en la parte externa hidrofílica se encuentran los fosfolípidos, colesterol y la parte proteica de estas moléculas, las apolipoproteínas.

Las apolipoproteínas presentes en las lipoproteínas presentan tres funciones: solubilización de lípidos, activación o inhibición de las enzimas que regulan el metabolismo lipoproteínas y mediación de la interacción de las lipoproteínas con receptores específicos de la superficie celular. Algunas de las apolipoproteínas se mantienen siempre dentro de las mismas lipoproteínas, denominándose apolipoproteínas estructurales (apo B-100 y apo B-48). Otras son intercambiables y se trasladan de unas lipoproteínas a otras en función de la situación metabólica, son las denominadas apolipoproteínas funcionales o solubles (apo A-I, apo A-II, apo A-IV, apo V, apo C, apo D y apo E).

Las lipoproteínas se clasifican en diferentes familias en función de su densidad o de su movilidad electroforética. Encontramos los siguientes tipos de lipoproteínas:

- Quilomicrones (QM)
- Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)
- Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL)
- Lipoproteínas de baja densidad (LDL)
- Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Existen también otras lipoproteínas:

- Lipoproteína (x).

Proteína anormal que se encuentra en pacientes con enfermedad obstructiva biliar y desaparece de la circulación cuando se trata la colestasis que la ha originado. Es una lipoproteína con gran contenido lipídico (90%) constituido por fosfolípidos, colesterol no esterificado, triglicéridos y colesterol esterificado. Respecto a la parte proteica está constituida por apo C y albúmina.

- Lipoproteína (a).

Es una lipoproteína altamente glicosilada que se sintetiza en el hígado y tiene una estructura similar a la lipoproteína de baja densidad (LDL), pero se encuentra en concentraciones más bajas. Al igual que la LDL presenta en su estructura una molécula de apo B-100 que en el caso de la lipoproteína (a) se encuentra unida por un puente disulfuro a una apolipoproteína llamada apo (a).

La apolipoproteína (a) presenta una estructura similar al plasminógeno, pero sin actividad enzimática. Se caracteriza por tener un número variable de repeticiones de unos dominios denominados "kringle 4", que determinan el tamaño de las diferentes isoformas.

- **Metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas.**

Existe una alta interrelación entre el metabolismo de las diferentes lipoproteínas (Figura 1). Este metabolismo es un

proceso dinámico que implica un intercambio entre los lípidos, apolipoproteínas, enzimas y receptores:

- **Quilomicrones (QM):**

Su principal función es aportar a los tejidos los lípidos que se han incorporado al organismo a través de la dieta. Son las lipoproteínas de mayor tamaño y menor densidad. Presentan menos contenido proteico y un componente lipídico muy enriquecido en triglicéridos (80%) en este caso de origen exógeno. En su superficie presentan las apolipoproteínas: apo B-48, apo A-I, apo A-IV, apo E, apo C-I, apo C-II y apo C-III.

Una vez absorbidos y empaquetados, los quilomicrones pasan a linfa y después a sangre. A nivel capilar, se cataliza la hidrólisis de los triglicéridos que componen las partículas de los quilomicrones por acción de la enzima lipoproteína lipasa (LPL). La LPL necesita de la presencia de apo C-II, que actúa como cofactor, en la superficie de los quilomicrones para poder realizar su acción. Como resultado de ello, las partículas de quilomicrones reducen su tamaño y se denominan quilomicrones residuales, que son captados por los receptores hepáticos gracias al reconocimiento de la apo E presente en la superficie de la lipoproteína.

- **Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).**

Con función análoga a los quilomicrones, se encargan de transportar triglicéridos de origen endógeno a los tejidos. Son partículas grandes y muy ricas en triglicéridos de síntesis hepática y con una composición en apolipoproteínas similar a los quilomicrones. A diferencia de los quilomicrones, las VLDL presentan en su superficie apo B-100 en vez de apo B-48, junto con apo E y apo C-II. Gracias a la presencia de esta última, la lipoproteína lipasa (LPL) puede actuar sobre VLDL dando lugar a lipoproteínas de densidad intermedia (IDL).

- **Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL).**

Grupo de lipoproteínas minoritario que se forman a partir de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), asemejándose en la composición. Son partículas más pequeñas y densas que presentan una mayor cantidad de colesterol. Se cree que la mitad de las partículas de IDL son captadas por receptores hepáticos mediante el reconocimiento de la apo E de la superficie de las lipoproteínas, mientras que la otra mitad se convierten en lipoproteínas de baja densidad (LDL) a través de la acción de la lipasa hepática (LH).

- **Lipoproteínas de baja densidad (LDL).**

Su función es transportar colesterol a las células, tejidos periféricos e hígado. Presentan en su superficie apo B-100 y tienen como principal componente a los ésteres de colesterol. Son reconocidas por sus receptores hepáticos por la presencia de apo B-100 y apo E en la superficie de las lipoproteínas. Al unirse al receptor, el complejo lipoproteína-receptor es internalizado y el contenido proteico y lipídico es

hidrolizado hasta aminoácidos y colesterol no esterificado. El colesterol no esterificado es tóxico para las células por encima de una cierta concentración, de manera que debe ser utilizado o convertido en ésteres de colesterol mediante la acción de la enzima acil:colesterol aciltransferasa (ACAT). Una vez esterificados, estos ésteres de colesterol pueden ser guardados como reservorio celular de colesterol.

- Lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Se sintetizan en el intestino, hígado y plasma para ayudar en el metabolismo de quilomicrones y VLDL. Las HDL se encargan de ceder apolipoproteínas a quilomicrones y VLDL, como apo C-II y apo E, para que sobre esas lipoproteínas puedan actuar lipoproteína lipasa (LPL) y se produzca la interacción con receptores hepáticos de apo E. Es por ello que la síntesis de HDL depende del metabolismo de estas partículas ricas en triglicéridos (QM y VLDL).

Captan el colesterol de los tejidos periféricos mediante la proteína transportadores ABCA1 (casete transportador A1 de unión al ATP) que permite la transferencia de colesterol de los tejidos a las partículas de HDL y éstas devuelven el colesterol al hígado donde se forman los ácidos biliares para su eliminación. Este proceso se conoce como transporte inverso o reverso del colesterol y confiere un papel antiaterogénico a esta lipoproteína.

Las HDL también captan de la circulación a la enzima lecitin:colesterol aciltransferasa (LCAT) que se encarga de esterificar el colesterol que contienen estas lipoproteínas al transferirles un grupo lecitina. La LCAT actúa gracias a la presencia de apo A-I en la superficie de HDL. La proteína transferidora de ésteres de colesterol (CEPT) es otra enzima implicada en el metabolismo de las HDL que se encarga de transferir los ésteres de colesterol de las partículas de HDL a otras lipoproteínas como VLDL y quilomicrones.

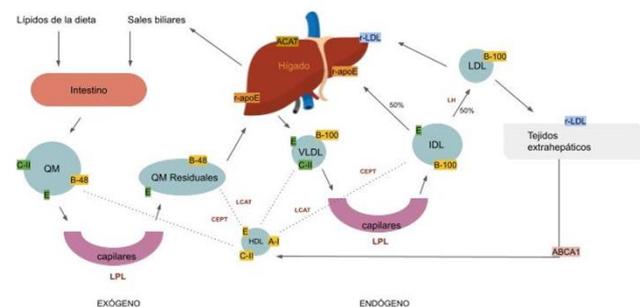


Figura 1. Metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas. Adaptado de: Errico T. L. Et al, 2013

DISLIPEMIAS

Las dislipemias son aquellas condiciones patológicas donde existe una alteración del metabolismo de los lípidos, como consecuencia de ellos se presentan concentraciones de lípidos alteradas tanto por exceso (hiperlipemias) como por defecto (hipolipemias).

Se considera a las dislipemias como una de las patologías más importantes y frecuentes en la práctica clínica y uno de los factores de riesgo cardiovascular más ligados

íntimamente a la enfermedad cardiovascular por lo que su diagnóstico a partir de un análisis de rutina de laboratorio es de importancia.

Estas alteraciones pueden clasificarse en función del fenotipo lipídico o de la etiología que las produce.

En el caso de la clasificación fenotípica, la Organización Mundial de la Salud en 1972 aceptó como estándar mundial la clasificación realizada por Fredrickson que se basaba en el fenotipo lipoproteínas encontrado mediante electroforesis o ultracentrifugación y que clasificaba las alteraciones en seis tipos (Tabla 1).

Fenotipo	Aumento de las lipoproteínas	Aumento de los lípidos
I	Quilomicrones	Triglicéridos
IIa	LDL	Colesterol
IIb	LDL y VLDL	Colesterol y triglicéridos
III	VLDL y quilomicrones	Triglicéridos y colesterol
IV	VLDL	Triglicéridos
V	Quilomicrones y VLDL	Triglicéridos y colesterol

Tabla 1. Clasificación de Fredrickson para las lipoproteínas. Adaptado de: <https://www.msmanuals.com/es-es/professional/multimedia/table/patrones-de-lipoprote%C3%ADnas-fenotipos-de-fredrickson>

La clasificación de Fredrickson clasifica a las dislipemias por fenotipos pero carece de interés práctico para el médico general, al que resulta de mayor interés la división de estas patologías en función de su etiología en: dislipemias primarias y secundarias.

• **Dislipemias primarias.**

Su desarrollo se debe principalmente a causas genéticas y afectan al 5-10% de la población. La mayoría son de origen poligénico y las diferencias interindividuales se deben a la exposición a determinados factores genéticos, médicos o ambientales.

- **Hiperlipemias primarias.**

1. **Hipercolesterolemias primarias:** son entidades clínicas que cursan con aumentos de los niveles plasmáticos de LDL.

- **Hipercolesterolemia familiar (HF).** Trastorno genético codominante que en forma heterocigota se da en 1 de cada 500 individuos. Se debe principalmente a mutaciones en el gen del receptor

de LDL (hasta 1600 mutaciones). Los niveles de esta lipoproteína se mantienen elevados durante toda la vida y suelen oscilar entre 275-500 mg/dL. En el caso del resto de lípidos, triglicéridos y HDL, permanecen normales incluso bajos. Un característico síntoma de esta enfermedad es la aparición de xantomas tendinosos, depósitos intra y extracelulares de colesterol en los tendones.

- **Defecto familiar de apo B-100.** Es un trastorno autosómico dominante similar a la hipercolesterolemia familiar. Se produce por una mutación sin sentido en un aminoácido que afecta a la composición de la apolipoproteína presente en algunas lipoproteínas, lo que produce una disminución de la afinidad de las LDL por su receptor.
- **Hipercolesterolemia poligénica.** Dentro de este grupo se clasifican gran cantidad de alteraciones producidas por múltiples genes y que resultan en la producción excesiva o catabolismo reducido de las LDL. Los niveles de triglicéridos, colesterol y HDL se encuentran normales.

2. Hipertrigliceridemias primarias.

- **Hipertrigliceridemia familiar.** Se trata de un trastorno autosómico dominante del cual no han sido identificadas la mutación o mutaciones responsables. Se caracteriza tanto por una disminución del catabolismo de las VLDL como por un aumento de su producción, siendo los niveles de triglicéridos en ayunas de 250-750 mg/dL.
- **Deficiencia familiar de la lipoproteína lipasa (LPL).** Es un trastorno autosómico recesivo causado por una alteración o ausencia de la enzima lipoproteína lipasa (LPL), dando lugar a la acumulación de quilomicrones en plasma. Entre las manifestaciones de esta alteración encontramos los xantomas, hepatomegalia, esplenomegalia e infiltración de células espumosas a médula ósea.
- **Deficiencia familiar de apo C-II.** Es un trastorno autosómico recesivo que causa déficit funcional de la enzima LPL con unas manifestaciones parecidas a la alteración provocada por su déficit. Este trastorno lo que provoca es una alteración en la hidrólisis de quilomicrones y VLDL generando un acúmulo de las lipoproteínas.
- **Déficit de lipasa hepática.** Se considera un trastorno autosómico recesivo raro que altera el catabolismo de las VLDL e IDL.

3. Hiperlipemias mixtas.

- **Hiperlipemia familiar combinada.** Dislipemia primaria más frecuente. Se hereda de manera autosómica dominante y puede cursar con hipertrigliceridemia aislada, niveles aislados elevados de colesterol o ambos casos. Se desconoce el trastorno de base pero se ha descrito

que en algunas familias pueden contribuir polimorfismos de la lipoproteína lipasa (LPL) y del grupo de genes que codifica para las apolipoproteínas: apo A-I, apo C-II y apo A-IV. Se relaciona con un aumento de la secreción de VLDL y a veces con un descenso de los niveles de LDL.

- **Disbetalipoproteinemia.** Es un trastorno raro que aparece en 1 de cada 10000 personas y se debe principalmente a una homocigosis en la apo E, presentando un genotipo E2 en homocigosis. Este genotipo presenta una baja afinidad por el receptor de apo B/E a nivel hepático, produciendo elevaciones de los niveles de triglicéridos y colesterol VLDL. Es común en esta alteración la presencia de xantoma y de depósitos de colesterol en los surcos palmares.

- Hipolipemias primarias.

Son trastornos genéticos que se presentan con mucha menos frecuencia que las hiperlipemias primarias. Cursan con niveles bajos o incluso indetectables de lipoproteínas circulantes.

1. **Abetalipoproteinemia.** Es una enfermedad autosómica recesiva muy rara que se caracteriza por la ausencia de la proteína microsómica transportadora de triglicéridos (MTP), que es importante en la lipidación de la apolipoproteína B. Esta proteína se encarga de transferir lípidos a la apo B a medida que esta se va sintetizando a nivel del retículo endoplásmico. El resultado de esta deficiencia es que no pueden formarse las lipoproteínas que contienen apolipoproteína B: quilomicrones, VLDL, IDL y LDL. De esta manera se acumulan apo B-48 y apo B-100 en intestino e hígado dando lugar a niveles indetectables de apo B a nivel plasmático. Presentan niveles bajos de colesterol y alteración en la absorción de las grasas (por la alteración que producen en los quilomicrones) y en la distribución de colesterol a los tejidos periféricos (por la alteración a nivel de la LDL). Esto produce importantes alteraciones endocrinas, como ocurre con el cortisol o con vitaminas liposolubles (A, E y K) que se encuentran deficientes.
2. **Hipobetalipoproteinemia familiar.** Es una alteración autosómica dominante que cursa con baja concentración de apo B, colesterol total y colesterol LDL. Se produce por mutaciones en el propio gen de la apo B o en los lugares de regulación de su expresión. Existen numerosas variantes, resultado de las diversas mutaciones que puede sufrir el gen. El resultado de esta alteración es la producción de una apolipoproteína apo B deficiente o defectuosa. Si se produce una apo B pequeña esta no se puede lipidar y se degrada por el proteasoma. Las personas heterocigotas son normalmente asintomáticas y presentan niveles bajos de LDL, mientras que los homocigotos tienen características similares a la abetalipoproteinemia.
3. **Hipoalfalipoproteinemias.** Se trata de alteraciones caracterizadas por presentar unos niveles bajos de HDL,

menores de 35 mg/dL (20-29 mg/dL). Por tanto se presenta en estos pacientes, un elevado potencial aterogénico. Dentro de las hipotalipoproteinemias la más conocida es la enfermedad de Tangier o Analfalipoproteinemia.

La enfermedad de Tangier es una enfermedad rara autosómica recesiva provocada por la mutación en el gen que codifica la ABCA1, un transportador que incorpora el colesterol a las partículas de HDL. Esta deficiencia causa una alteración en la formación de las HDL nacientes y de la captación por parte de estas del exceso de colesterol de los distintos tipos celulares, especialmente de los macrófagos. Ello provoca un acelerado metabolismo de las HDL y una acumulación de ésteres de colesterol en los macrófagos de muchos tejidos (hígado, nódulos linfáticos, mucosa intestinal y piel). La concentración en plasma de HDL se encuentra muy baja o indetectable. Esta deficiencia cursa con enfermedad coronaria prematura, hepatoesplenomegalia, neuropatía periférica o amígdalas anaranjadas.

- **Dislipemias secundarias.**

Numerosas enfermedades, fármacos o hábitos dietéticos no saludables pueden provocar una alteración del metabolismo de las lipoproteínas que puede conducir a hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o ambas, principalmente.

Entre las enfermedades que se asocian secundariamente a las dislipemias se encuentran la diabetes mellitus, insuficiencia renal o anorexia nerviosa. El hígado presenta un papel central en el metabolismo de las lipoproteínas, de modo que una alteración hepática crónica afecta secundariamente a estas. (Tabla 2)

Una vez corregida la situación patológica que origina esta dislipemia, la alteración lipídica debería revertir. No obstante, se ha de tener en cuenta que pueden coincidir una enfermedad potencialmente hiperlipemiante y una hiperlipemia primaria. Por ello, si tras la curación o la retirada del fármaco persiste la dislipemia, sería necesario realizar

otros estudios bioquímicos y familiares para descartar una alteración primaria que se haya puesto de manifiesto durante la enfermedad.

EL PERFIL LIPÍDICO EN EL LABORATORIO CLÍNICO

El diagnóstico de las dislipemias se basa siempre en la comprobación analítica de la alteración lipídica. Se debe llevar a cabo una determinación del perfil lipídico en el que consten principalmente: colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos.

Los resultados obtenidos mediante estas determinaciones se deben considerar junto con fuentes de variación extraanalítica que obedecen a diferencias intraindividuales (efectos de la comida, dieta, postura y venostasis) e interindividuales (efectos geográficos, edad y sexo). Por ello es necesario disponer de al menos dos determinaciones lipídicas diferentes previas al diagnóstico de una dislipemia separadas por un periodo superior a 1 semana e inferior a 3 meses.

- **Perfil lipídico básico.**

Dentro del perfil lipídico básico destacan determinaciones como: colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL y colesterol no HDL (colesterol total - colesterol HDL).

- **Colesterol total (CT).**

Su finalidad principal es llevar a cabo un cribado del riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca o para comprobar la eficacia de un tratamiento hipolipemiante. Es una determinación que se recomienda realizar como cribado mínimo una vez cada 4-6 años en adultos que no presenten factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, aunque con frecuencia siempre se incluye en revisiones médicas rutinarias.

Si el paciente presenta otros factores de riesgo (tabaquismo, sobrepeso, sedentarismo, hipertensión, historia familiar de enfermedad cardiovascular precoz, diabetes mellitus o prediabetes, etc) se puede solicitar la determinación de colesterol total con una mayor frecuencia.

	Hipercolesterolemia	Hipertrigliceridemia	Dislipemia mixta
Causas frecuentes	Tabaquismo Colestasis Tiazidas Síndrome nefrótico Dietas cetogénicas	Consumo excesivo de hidratos de carbono simples Consumo de alcohol Embarazo Síndrome inflamatorio sistémico Hepatitis aguda Betabloqueantes Inhibidores de las proteasas	Obesidad Diabetes mellitus Enfermedad renal crónica Hipotiroidismo Lupus eritematoso sistémico Corticoterapia
Otras causas	Porfiria aguda intermitente Anorexia nerviosa Ciclosporina Carbamazepina	Neurolépticos Síndrome de Cushing Acromegalia Derivados de la vitamina A	Estrógenos exógenos

Tabla 2. Causas de dislipemias secundarias. Adaptado de: Galindo Rodríguez D., Aldao Argüelles I., 2023.

Los valores de referencia para este parámetro son los siguientes:

- <1 mes: 50-170 mg/dL
- 1 mes-12 años: 60-190 mg/dL
- >12 años: <200 mg/dL

Un colesterol elevado puede ser resultado de una enfermedad hereditaria o como consecuencia de una dieta rica en grasas saturadas, y en muchas ocasiones como combinación de ambas.

- Triglicéridos (TG).

Es una determinación útil para la monitorización de individuos que presentan riesgo cardíaco, que han presentado infarto agudo de miocardio o que están tratando una hipertrigliceridemia.

Se mantienen como valores objetivos entre 50 y 200 mg/dL.

- Colesterol HDL (c-HDL).

Su determinación es de utilidad como cribado para la revisión de la salud en individuos que no presentan factores de riesgo cardiovascular o como seguimiento de tratamientos. Es un parámetro que se considera en conjunto con el resto de las determinaciones incluidas en el perfil lipídico.

Se recomienda que los niveles de colesterol HDL se encuentren por encima de 55 mg/dL en hombre y superiores a 65 mg/dL en el caso de mujeres.

- Colesterol LDL (c-LDL).

Se determina habitualmente de manera indirecta a partir de ecuaciones como la de Friedewald: $c\text{-LDL (mg/dL)} = CT - [TG/5 + c\text{-HDL}]$.

Es una fórmula que permite calcular la cantidad de este tipo de colesterol utilizando los resultados del resto de determinaciones que componen el perfil lipídico básico. En la mayoría de los casos este cálculo proporciona una buena estimación de los niveles, pero se vuelve menos preciso en pacientes que presentan niveles de triglicéridos superiores a 400 mg/dL, cirrosis graves y otras afecciones. En esos casos se puede realizar la determinación directa de colesterol LDL, aplicando técnicas especiales o realizando cálculos menos limitados.

Existen otras fórmulas para la determinación de colesterol LDL:

1. Fórmula de Martin-Hopkins.

$c\text{-LDL (mg/dL)} = CT - c\text{-HDL} - TG/\text{Valor específico}$.

Se obtuvo y validó a partir de una gran base de datos de mediciones de lípidos obtenidos mediante métodos de ultracentrifugación. Utiliza una tabla de 180 celdas basada en triglicéridos y rangos de colesterol no HDL para seleccionar diferentes proporciones de TG/VLDL.

En el caso de la ecuación de Friedewald, se representa a la concentración de VLDL con un factor de corrección de 5 puesto que suponen aproximadamente $\frac{1}{5}$ del nivel de

triglicéridos totales. Sin embargo, debido a que el ratio de triglicéridos en las partículas de VLDL puede variar considerablemente dependiendo del tamaño y de otros factores, en la fórmula de Martin-Hopkins se incorpora un ratio TG:colesterol VLDL basado en las concentraciones de triglicéridos y colesterol no HDL obtenidas de una gran base de datos lipídicos. De esta manera se puede realizar una determinación más individualizada.

2. Fórmula de Sampson.

La ecuación se basa en mínimos cuadrados y análisis de regresión no lineal con valores clínicos de lípidos (triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL) como variables independientes y valores de colesterol LDL obtenidos por el método de referencia de cuantificación beta como variable dependiente.

Se puede utilizar en individuos con concentraciones de triglicéridos superiores a 800 mg/dL.

Los niveles de c-LDL elevados se consideran indeseables porque favorecen el depósito del exceso en las paredes de los vasos sanguíneos, contribuyendo al endurecimiento de las paredes y a la generación de la enfermedad cardíaca.

Se considera que el c-LDL es el más importante para establecer el riesgo de enfermedad cardíaca y para controlar si el tratamiento hipolipemiante ha sido eficaz en la reducción de los valores de colesterol. A pesar de ello, para establecer un tratamiento se deben considerar los valores de LDL en conjunto con factores de riesgo.

En función del nivel de riesgo cardiovascular (RCV) que presente el paciente se establecen diferentes rangos de referencia para este parámetro:

RCV muy elevado: ≤ 70 mg/dL

RCV elevado: ≤ 100 mg/dL

RCV moderado: ≤ 130 mg/dL

RCV bajo: ≤ 160 mg/dL

- Colesterol no HDL (no c-HDL).

Se determina mediante cálculo a partir de otros parámetros del perfil lipídico:

$\text{No c-HDL} = CT - c\text{-HDL}$

Se utiliza para la estimación de la cantidad total de lipoproteínas aterogénicas en plasma, algunas de las cuales no son determinadas habitualmente en la práctica clínica diaria: VLDL, IDL, LDL y lipoproteína (a).

Se pretende en general que los niveles de colesterol no HDL se encuentren por debajo de 145 mg/dL.

● Perfil lipídico completo.

Se puede crear también un perfil lipídico completo añadiendo otras determinaciones como: apolipoproteína A1, apolipoproteína B y lipoproteína (a). Además de la utilización de diferentes cocientes lipoproteicos que también colaboran en la valoración de riesgo cardiovascular.

- Apolipoproteína B.

La apolipoproteína B es el principal constituyente proteico de las lipoproteínas LDL, IDL, VLDL y lipoproteína (a). Es por ello que las concentraciones de esta apolipoproteína reflejan cual es la masa circulante de estas lipoproteínas (el 90% de apo B total circulante lo contiene la lipoproteína de baja densidad LDL).

El valor de la apolipoproteína B aumenta en: embarazo, hipercolesterolemia, receptores de LDL defectuosos, obstrucción biliar, hiperlipemia tipo II y síndrome nefrótico. En el caso de hepatopatías, sepsis, administración de estrógenos o cirugías, sin embargo, el valor podría verse disminuido.

Se recomienda incorporar la medida de apo B en el perfil lipídico cuando existe historia personal o familiar cardíaca y/o aumento de la concentración de colesterol y triglicéridos, y el médico pretende establecer el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. Otras veces se determina para monitorizar el tratamiento de concentraciones elevadas de colesterol o para diagnosticar la patología por déficit de la apolipoproteína.

En el caso de la hiperlipidemia familiar combinada (dislipemia primaria), un valor de apo B mayor de 120 mg/dL por ejemplo, hace más plausible su diagnóstico. De esta manera se podría diferenciar más fácilmente la dislipemia primaria del síndrome nefrótico (dislipemia secundaria).

Los niveles de referencia en hombre se encuentran entre 66-113 mg/dL, mientras que en mujeres entre 60 y 117 mg/dL.

- Apolipoproteína A1.

La apolipoproteína A1 es el constituyente mayoritario e indispensable de las HDL, que se encargan de recoger el exceso de colesterol de las células y transportarlo hacia el hígado para reciclarlo o eliminarlo. La medida de apolipoproteína A1 en suero reproduce perfectamente el valor predictivo de enfermedad coronaria que muestra el análisis de la concentración en suero de HDL.

Su determinación se suele combinar con la de la apolipoproteína B y el cálculo del cociente apo B/apo A1 que permite reconocer trastornos del metabolismo lipídico y el riesgo de desarrollar aterosclerosis y cardiopatía coronaria.

La determinación de apolipoproteína A1 por ejemplo es de gran utilidad en la detección de la enfermedad de Tangier (analfalipoproteinemia), donde se presentan niveles disminuidos de HDL (y por tanto de apo A1) y una alteración del transporte reverso del colesterol.

Los valores de referencia para la apolipoproteína A1 se establecen en:

Hombres: 104-202 mg/dL

Mujeres: 108-225 mg/dL

- Lipoproteína (a).

La determinación de lipoproteína (a) puede realizarse mediante diferentes métodos: ensayos inmunoenzimáticos

(ELISA), inmunturbidimétricos, nefelometría y ensayos de fluorescencia.

Es una determinación que proporciona información adicional del riesgo de desarrollar enfermedad cardíaca. Unos niveles elevados de lipoproteína (a) se consideran un factor de riesgo de enfermedad cardíaca independiente de de otros lípidos. La concentración de esta lipoproteína en sangre viene determinada genéticamente (gen LPA) y se mantiene relativamente constante durante toda la vida del individuo, manteniéndose inalterable incluso con cambios en el estilo de vida o tratamientos. Se cree que una concentración elevada de lipoproteína (a) contribuye al riesgo cardíaco global.

La determinación de este parámetro no se solicita de manera rutinaria ni forma parte del perfil lipídico y suele acompañarse de otros marcadores de riesgo cardíaco cuando se presenta una historia familiar de enfermedad cardiovascular prematura no explicable. Se solicita en casos de: enfermedad cardíaca o vascular conocida, predisposición genética a tener aumento de colesterol en sangre y en accidentes cerebrovasculares o infarto agudo de miocardio.

Como objetivo terapéutico se considera adecuado un nivel de lipoproteína (a) inferior a 125 nmol/L.

Existen algunas limitaciones en la medida de estas concentraciones de la lipoproteína, principalmente debido a la gran heterogeneidad de las partículas de lipoproteína (a) por el tamaño variable de su apolipoproteína (a) e isoformas resultantes de las repeticiones de los dominios "kringle" que la componen. Los anticuerpos en inmunoensayos son policlonales y reaccionan de manera cruzada con las repeticiones por lo que sobreestiman la concentración en plasma de lipoproteína (a) en individuos que presentan isoformas grandes y se subestiman en aquellos con isoformas pequeñas. Como solución, podrían emplearse métodos en los que se disponga de un anticuerpo frente a apolipoproteína (a) y otro frente a apolipoproteína B-100 (también presente en la lipoproteína (a)).

El valor objetivo que se asigna al material de referencia está en nmol/L de lipoproteína (a), lo cual refleja la interacción molar del anticuerpo de la técnica con la apolipoproteína (a) presente en la lipoproteína (a). Históricamente se había expresado en unidades de masa (mg/dL), (considerando el contenido en apolipoproteínas, colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos, triglicéridos y carbohidratos), lo cual podría resultar inadecuado pues en los inmunoensayos realmente se determina el contenido proteico de la partícula (interacción con la apolipoproteína) y no en su contenido en lípidos y carbohidratos. Los factores de conversión entre ambas unidades no pueden aplicarse puesto que dependen de las isoformas.

Se considera un valor adecuado de lipoproteína (a) cuando se encuentran por debajo de 125 nmol/L.

Además, el hecho de la utilización de unidades adecuadas de medida es fundamental, pues condiciona la correcta estratificación del riesgo cardiovascular de los pacientes en los que se mide este parámetro.

- **Cocientes lipoproteicos.**

1. CT/ c-HDL
2. C-LDL/ c-HDL
3. No c-HDL/ c-HDL
4. Apolipoproteína B/ Apolipoproteína A1
5. TG/ c-HDL
6. c-LDL/ Apolipoproteína B

• **Ultracentrifugación.**

Se considera el método de referencia para la determinación directa de las lipoproteínas. En él se aprovecha el hecho de que las lipoproteínas tienen una densidad inferior al resto de proteínas plasmáticas forzando su flotación a densidades concretas por medio de campos gravitatorios intensos.

El método consiste en realizar una centrifugación de la muestra durante 17 horas a 40000 rpm tras añadir una solución de densidad conocida (1.006 kg/L). Se obtiene un sobrenadante con lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL o QM), mientras que en el infranadante se puede realizar la determinación de c-HDL y LDL que se obtendrá restando el valor de HDL al total de colesterol determinado en ese infranadante que se había cogido.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Candás Estébanez B., Pocoví Miera M., Romero Román C., Vella Ramírez J. C., Esteban Salán M., Castro Castro M. J., Puzo Foncillas J. (2019). Estrategia para el diagnóstico de las dislipemias. Recomendación 2018. Revista del Laboratorio Clínico 2019;12(4): e21-e33.
- Cribado neonatal [Internet]. Comunidad de Madrid. Disponible en: <https://www.comunidad.madrid/servicios/salud/cribado-neonatal>
- Errico T. L., Chen X., Martín Campos J. M., Julve J., Escolà-Gil J. C., Blanco-Vaca F. Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. Clínica e Investigación En Arteriosclerosis. 2013; 25(2), 98-103.
- Galindo Rodríguez D., Aldao Argüelles I. Trastornos lipídicos. En: Manual de Diagnóstico y Terapéutica Médica Hospital Universitario 12 de Octubre. 9ª edición. Madrid (España): MSD; 2023. p. 815-826.
- González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 3ª ed. Barcelona: Elsevier; 2019.
- Maki K. C., Grant J. K., Orringer C. E. LDL-C Estimation: The perils of living with imperfection. Journal of the American College of Cardiology. 2022;79(6):542-544.
- Nelson D. L., Cox M. M. Lehninger. Principios de bioquímica. 7ª ed. Barcelona: Omega; 2018.
- Nordestgaard B. G., Chapman M. J., Ray K., Borén J., Andreotti F., Watts G. F. et al. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Lipoprotein (a) as a cardiovascular risk factor: Current status. Eur Heart J. 2010;31:2844-53.
- Palacios M., Esteban M., Aguilar A. A., Ortolá J. B. Recomendaciones para la determinación de la concentración del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comité Científico. Química Clínica. 1999;18(1): 33-40.
- Patrones de lipoproteínas (fenotipos de Fredrickson) [Internet]. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es-es/professional/multimedia/table/patrones-de-lipoprote%C3%ADnas-fenotipos-de-fredrickson>
- Sociedad Española de Endocrinología (SEEN). Manual de Endocrinología y Nutrición [Internet]. España: Licitelco S.L; 2015. Disponible en: <https://manual.seen.es/home>

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

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

**Ambas autoras han participado por igual*

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

Palabras clave: líquido cefalorraquídeo, citología, bioquímica

INTRODUCCIÓN

El líquido cefalorraquídeo (LCR) es un fluido complejo que se encuentra en el espacio subaracnoideo, entre las membranas meníngicas aracnoides y piamadre, contenido en los ventrículos del cerebro y las cisternas que lo rodean.

Se produce mayoritariamente en los plexos coroideos de los ventrículos laterales y del tercer y cuarto ventrículo, a un ritmo de unos 500 ml al día. Se genera tanto por ultrafiltración a través de la pared capilar coroidea, como por secreción del epitelio coroideo y extracoroideo del cerebro. Otras zonas de síntesis son el revestimiento ependimario de los ventrículos y el espacio cerebral subaracnoideo.

Una vez formado el líquido fluye y se localiza una pequeña cantidad de forma constante, unos 30ml, en los ventrículos y cisternas; unos 120 ml penetran dentro del espacio subaracnoideo, donde baña los hemisferios cerebrales y circula hacia abajo por la médula espinal.

Con el objetivo de mantener un volumen apropiado (90-150 mL en adultos y 10-60 mL en neonatos), el LCR se reabsorbe en las vellosidades aracnoideas. Se trata de unas proyecciones que se introducen dentro de las paredes de los senos venosos y que presentan unas características particulares que permiten el paso del LCR. Cualquier desequilibrio entre la producción y la reabsorción de este está asociado a patologías graves.

Cuando hablamos del LCR es importante mencionar una estructura, la barrera hematoencefálica, barrera fisiológica que separa el sistema nervioso central (SNC) y el LCR de la sangre. El epitelio de los plexos coroideos y el endotelio de los capilares en contacto con el LCR constituyen esta estructura, que permite que se mantenga una composición diferente entre el LCR y la sangre en cuanto a su contenido en proteínas, iones, agua, etc, aunque presentan una osmolalidad muy parecida. En caso de que se produzcan alteraciones debido a traumatismos del SNC, inflamación de las meninges u obstrucciones producidas por neoplasias o hemorragias intracraneales, la circulación del LCR puede alterarse, lo que se refleja en su composición pudiendo detectarlo.

En cuanto a las funciones del LCR, las principales que se le asocian son:

- Soporte y protección del SNC.
- Control de las características químicas en torno al SNC.
- Transporte de determinadas hormonas y neurotransmisores.
- Vehículo para la excreción de productos de desecho generados durante procesos del metabolismo cerebral.

El análisis del LCR permite tener información sobre procesos patológicos relacionados con el encéfalo, médula y meninges, además de los procesos hemorrágicos producidos en las cavidades que los contienen.

OBTENCIÓN DEL LCR

Para la obtención de la muestra de LCR se lleva a cabo una punción lumbar, técnica que debe realizarse una vez comprobado que no existe presión intracraneal elevada, examinando el fondo de ojo o realizando una tomografía axial. Además, es recomendable el estudio de coagulación previo a la punción.

La punción se realiza entre las vértebras lumbares L4-L5 o inferiores para evitar lesionar la médula espinal, y el paciente se coloca en decúbito lateral, con el mentón pegado a las rodillas, ya que en esta posición quedan abiertos los espacios intervertebrales. Se introduce una aguja biselada en el espacio intervertebral hasta llegar al espacio subaracnoideo y se retira lentamente el fiador interno de la aguja para dejar salir el líquido hasta el recipiente adecuado.

La muestra se recoge en tres tubos estériles de forma secuencial, siendo el primero para estudio bioquímico, el segundo para el microbiológico y el último, para el citológico. Una vez obtenida la muestra debe enviarse inmediatamente al laboratorio para su procesamiento.

Como complicaciones asociadas a la realización de la punción lumbar se encuentran: enclavamiento del cerebelo o amígdalas, meningitis, hematoma subdural o extradural, e infecciones iatrogénicas.

El riesgo y la dificultad asociada a esta extracción hacen que sea una muestra muy valiosa, por lo que hay que tener claras las indicaciones para su obtención. Se debe hacer punción lumbar ante sospecha de:

- Meningitis.
- Hemorragias subaracnoideas, también para distinguir entre hemorragia intracraneal e infarto.
- Abscesos cerebrales.
- Encefalitis, síndrome de Guillain-Barré, o enfermedades desmielinizantes.
- Enfermedades sistémicas inflamatorias o autoinmunes.
- Enfermedad de Alzheimer o de Creutzfeldt-Jacob.
- Leucemias o determinadas neoplasias.

ESTUDIO DEL LCR

• Estudio macroscópico

El LCR se dice que es como “agua de roca”, ya que es incoloro, inodoro y con viscosidad similar a la del agua. Hay diversas patologías que provocan cambios en su aspecto macroscópico y que pueden orientar el diagnóstico:

- LCR turbio: sugiere un aumento del recuento celular por encima de 200 células nucleadas/ μL o de 400 hemáties/ μL . También la presencia de microorganismos o la alta concentración de proteínas es causa de la turbidez de la muestra.
- LCR hemático: resultado de una punción traumática o de un sangrado patológico debido a una hemorragia subaracnoidea, intracerebral o traumatismo.
- Otros: purulento, lechoso, aceitoso (contraste radiológico).

En relación con los LCR hemáticos, para poder diferenciar el origen de la sangre, puede realizarse la prueba de los tres tubos, observar la coagulación o analizar la xantocromía.

La prueba de los tres tubos consiste en observar la coloración en los tres tubos extraídos. En caso de ser una punción traumática, el color del LCR en cada tubo se irá aclarando progresivamente, en cambio si es producto de una hemorragia, el color se mantiene.

Otro parámetro que ayuda a distinguir las dos entidades es la coagulación, en caso de ser producto de una punción traumática, el LCR se coagulará. Pero si la sangre viene derivada de una hemorragia subaracnoidea no se coagulará *in vitro*.

Además, el estudio de la xantocromía es importante en estos casos. La xantocromía hace referencia a la coloración rosada o anaranjada del sobrenadante del LCR tras su centrifugación. Es producto de la lisis de eritrocitos y aparece pasadas de 2 a 4 horas tras una hemorragia subaracnoidea. Pasadas 12 horas comienza a tornarse amarillento, con una intensidad máxima a las 24-36 horas, desapareciendo a los 4-8 días. En caso de ser una muestra traumática, el sobrenadante es transparente.

Hay que tener en cuenta que puede aparecer una falsa xantocromía asociada a:

- Presencia de bilirrubina procedente del plasma, cuando esta supera los 5 mg/dl de concentración.
- Demora en la centrifugación de un líquido hemático (si permanecen más de 2-4 horas los hemáties en contacto con el LCR).
- Casos de hipercarotenemia.
- Presencia de melanina en casos de melanosarcoma en las meninges.
- Contaminación con mertiolato o desinfectantes yodados utilizados durante la desinfección de la zona de punción.
- Recién nacidos prematuros, por la concentración elevada de bilirrubina y proteínas en plasma y por la inmadurez de la barrera hematoencefálica.

• Estudio microscópico

Se recomienda realizar el estudio citológico antes de que transcurran 2 horas de su extracción para evitar la lisis celular.

El análisis debe realizarse mediante recuento manual en cámaras citométricas (Neubauer, Fuchs Rosenthal o Thoma) con el líquido sin diluir. Tomando por ejemplo la de Neubauer, se realiza el recuento de eritrocitos y células nucleadas en los cuatro cuadrantes externos (Figura 1), calculando después la concentración mediante la fórmula:

$$\text{Concentración Hemáties/Leucocitos} = \frac{\text{Contaje Hemáties/Leucocitos}}{4} \times 10$$

Donde el 4 hace referencia al número de cuadrantes contados y 10 es el volumen corregido:

- Cada cuadrante mide 1mm de lado y la cámara tiene 0,1mm de profundidad, por lo que el volumen contado es 0,1mm³ (0,1 μL).
- El conteo se realiza en células/0,1 μL , por lo que para informarlo en células/ μL , hay que multiplicar el valor por 10.

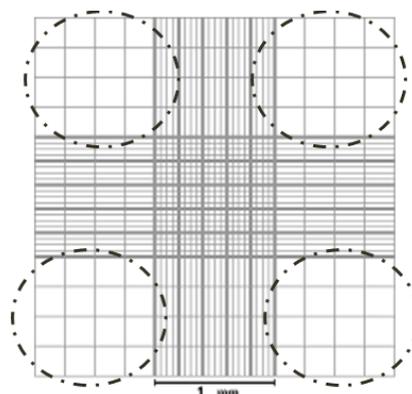


Figura 1. Cámara de Neubauer con los cuatro cuadrantes donde se realiza el conteo señalado. Elaboración propia.

No debe realizarse el recuento automático mediante autoanalizadores de hematimetría en líquidos con escasa celularidad, ya que estos equipos carecen de suficiente sensibilidad analítica.

El recuento diferencial de leucocitos se realiza en caso de presentar más de 10 células nucleadas en el recuento. Se puede hacer realizando una dilución 1:1 con solución Turk (ácido acético glacial que lisa hemáties y azul de metileno que tiñe los núcleos de los leucocitos) y posteriormente analizarlo al microscopio en cámara de recuento (Figura 2).



Figura 2. Leucocitos al microscopio 40x tras tratar con solución Turk el LCR. Izquierda: leucocito polimorfonuclear; Derecha: leucocitos mononucleares. Elaboración propia

	Edad	Concentración celular
Hematíes	Recién nacido	0 – 50/ μ L
	3 meses	0 – 5/ μ L
	Adultos	0 – 5/ μ L
Leucocitos	0 – 1 mes	0 – 270/ μ L
	2 meses – 16 años	0 – 7/ μ L
	Adultos	0 – 5/ μ L

Tabla 1. Intervalos de referencia del recuento celular por edad. Adaptado de Merino A., 2020.

Tras efectuar el diferencial leucocitario es recomendable, realizar una citocentrífuga, ya que es un método de concentración celular que además preserva la morfología de las mismas, lo que permite un estudio citológico más exhaustivo. En caso de no disponer de citocentrífuga, se puede centrifugar el LCR a 500 rpm durante 5 minutos, separar el sobrenadante, resuspender el sedimento y hacer una extensión y posterior tinción.

El número total de células por microlitro de un adulto sano oscila entre 0 y 5, que en el caso de las células nucleadas corresponden en su mayoría a linfocitos (63-99%), y en segundo lugar a macrófagos (3-37%), los neutrófilos (0-2%) son minoritarios. En cambio, en los recién nacidos el intervalo de referencia es mayor (Tabla 1).

El aumento del número de células se denomina pleocitosis. Si la pleocitosis no supera la cifra de 300 células/ μ L, el predominio celular suele ser linfocitario y se asocia generalmente a procesos subagudos o crónicos. Cuando el recuento celular se encuentra muy aumentado, y predominan los neutrófilos, suele deberse a procesos sépticos agudos. En caso de encontrar aumento de eosinófilos, el origen puede ser una enquistación parasitaria (cisticercosis, hidatidosis) o causas no infecciosas como inyecciones intratecales, medios de contraste radiológico o reacciones medicamentosas. Según el grado de pleocitosis en el LCR, se diferencian dos categorías vinculadas a diferentes procesos clínicos:

1. Pleocitosis leve (10-30 células/ μ L) y/o moderada (30-100 células/ μ L):
 - Reacciones meníngeas o meningismos, meningitis muy focalizadas y meningitis asépticas.
 - Meningitis tuberculosas, donde hay un predominio de linfocitos junto con un descenso marcado de glucosa.
 - Encefalitis, poliomeilitis y diversas formas de neurosífilis.
 - Tumores cerebrales o medulares.
 - Infiltración por células hematológicas malignas.
2. Pleocitosis marcada (>100 células/ μ L):
 - Meningitis bacterianas, con predominio de neutrófilos.
 - Meningitis linfocitarias benignas.

- Meningitis tuberculosa grave.
- Rotura de absceso cerebral.
- Infiltración por células hematológicas malignas.

En los líquidos biológicos, tanto LCR como los líquidos serosos además de estas células es posible encontrar células anormales de origen diverso, como neoplasias hematológicas y no hematológicas (tumores primitivos del SNC o metástasis de tumores de otras localizaciones).

• Magnitudes bioquímicas

El estudio bioquímico del LCR incluye la determinación de diferentes analitos. Entre los más habituales se encuentran los siguientes:

– Glucosa:

La glucosa es una molécula capaz de atravesar la barrera hematoencefálica desde el plasma pasando así al LCR a través de mecanismos de difusión pasiva y transporte activo, dependiendo, por tanto, la concentración de glucosa en LCR de la glucemia. Esta dependencia hace necesaria la medición de la glucosa sanguínea a la par que la medición de la glucosa en LCR.

La concentración de glucosa en LCR en un adulto es aproximadamente entre un 50 y un 80% de la glucemia (50-80 mg/dL).

El incremento de la concentración de glucosa en LCR no tiene significación diagnóstica, pero puede enmascarar el consumo de glucosa. Sin embargo, su disminución, por debajo de 40 mg/dL, es indicativa de hipoglucemia prolongada, déficit en el transporte activo o, en la mayoría de los casos, de consumo celular. Las células que suelen aparecer en LCR y causan una disminución de glucosa pueden ser microorganismos (meningitis bacteriana, tuberculosa o micótica), leucocitos (como neutrófilos en meningitis bacteriana o linfocitos en el caso de la meningitis tuberculosa), o células neoplásicas en casos de infiltración del sistema nervioso central.

La monitorización de los niveles de glucosa en LCR se pueden emplear en el estudio de la respuesta a tratamiento ya que sus valores se normalizan tras un tratamiento eficaz.

– **Proteínas totales:**

La presencia de proteínas en el LCR varía con la edad. Los recién nacidos presentan una concentración de entre 30 y 140 mg/dL debido a la inmadurez de la barrera hematoencefálica pero estos niveles descenderán en el primer año de vida. Sin embargo, los adultos presentan una concentración muy baja en comparación con el nivel de proteínas plasmáticas, entre 15 y 45 mg/dL, siendo la proteína mayoritaria en ambos casos, la albúmina.

Las proteínas totales pueden verse elevadas por diferentes mecanismos fisiológicos como un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, un flujo reducido de LCR, síntesis intratecal o destrucción de tejido cerebral. Todo ello puede ser debido a meningitis, sobre todo bacteriana, hemorragias, tumores o esclerosis múltiple y otras degeneraciones del tejido cerebral.

– **Lactato:**

En este caso, la concentración de lactato en LCR no está relacionada con la concentración de lactato sanguíneo debido a la escasa difusión de este analito a través de la barrera hematoencefálica. Se trata de un producto del metabolismo anaerobio en el sistema nervioso central.

Su concentración se ve incrementada en trastornos que generan hipoxia, tumores cerebrales o hidrocefalia. Además, su determinación es de gran utilidad en el diagnóstico precoz de meningitis ya que los niveles de lactato se incrementan antes del aumento de leucocitos. En el caso de meningitis fúngicas o tuberculosas superan los 25 mg/dL mientras que en bacterianas llegan a superar los 35 mg/dL.

– **Adenosina desaminasa (ADA):**

Se trata de un marcador útil en el diagnóstico de meningitis tuberculosa.

CONCLUSIONES

El estudio de LCR es de gran utilidad para el diagnóstico de diferentes patologías como la meningitis.

Es importante conocer en el laboratorio que se trata de una muestra valiosa debido a su difícil extracción por lo que ha de ser estudiado con consideración.

Como se ha detallado a lo largo del capítulo, el estudio del LCR en un laboratorio de bioquímica clínica consta de tres partes: estudio macroscópico, estudio microscópico y cuantificación de diferentes magnitudes bioquímicas. En caso de sospecha de causa infecciosa, este análisis se ha de completar con un estudio microbiológico para confirmar o descartar la etiología infecciosa.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- E. Guillén Campunzano et al. Recomendaciones para el estudio del líquido cefalorraquídeo. Documentos SEQC. 2010
- Merino A. Citología de líquidos biológicos (serosos y cefalorraquídeo) y su utilidad diagnóstica. En: Merino A. Manual de citología de sangre periférica y líquidos biológicos. 2º edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2020. p:213-252.
- González Hernández A, Alegre Martínez E, Mugueta Uriaque C, Restituto Aranguíbel P, Varo Cenarruzabeitia N. Estudio de líquidos biológicos. En: González A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 3º ed. Barcelona: Elsevier; 2019. p. 199-206.

BLOQUE II

SESIONES DE CALIDAD

TIPOS DE LIDERAZGO APLICADOS A INSTITUCIONES SANITARIAS

Autor: Daniel Párraga García, Jose Miguel Comino Cáceres, Belén Ontañón Nasarre

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

Palabras clave: Liderazgo, Servicios de salud, Gestión

INTRODUCCIÓN

El liderazgo se ha definido de diversas formas, a veces muy imprecisas, pero es comúnmente aceptado que sus actividades clave son influenciar y direccionar, con énfasis en elementos intangibles (valores, misión, motivación) y que tiene a las personas como objeto de su ejercicio.

Una definición que recoge y subraya las características esenciales del concepto de liderazgo contendría los siguientes términos:

- **Proceso.** El liderazgo es acción, se manifiesta haciendo; no es algo pasivo, sin consecuencia, ni resultado.
- **Individual.** Los líderes son individuos; no son grupos, ni organizaciones.
- **Influencia.** Es la palabra clave más importante. El liderazgo implica siempre influencia en los pensamientos, sentimientos y acciones de otras personas.
- **Se ejerce sobre otras personas o grupos.** No hay liderazgo sin seguidores.
- **Intencionalmente.** El liderazgo no es accidental, se ejerce conscientemente.
- **Para lograr metas.** El liderazgo es instrumental, se ejerce para lograr propósitos concretos. Liderar implica direccionar, conducir hacia metas y en direcciones determinadas.

Para acabar de entender a qué nos referimos al hablar de liderazgo es conveniente distinguirlo de lo que no es, ya que puede confundirse con los conceptos de gestionar, administrar, poder y autoridad, pero es perfectamente diferenciable¹.

Qué es y qué no es liderar			
CONCEPTO	Palabra clave	Énfasis	Objeto principal
LIDERAR	Influenciar Direccionar	Intangibles: valores, visión, motivación	Personas

GESTIONAR	Manejar, Procurar Ordenar	Tangibles e intangibles	Personas y cosas. Recursos en general
ADMINISTRAR	Ejecutar Utilizar	Tangibles: recursos, físicos, presupuestos	Cosas
PODER	Influencia potencial	Tangibles y/o intangibles (según el tipo y fuente de poder)	Personas y/o cosas (según el tipo y fuente de poder)
AUTORIDAD	Poder formal	Tangibles e intangibles	Personas

Tabla 1. Qué es y qué no es liderar. Adaptado de: Saturno PJ, 2008.

¿LÍDER O GESTOR?

El liderazgo es uno de los varios papeles que el gestor debe ejecutar, probablemente el más importante de todos, pero no el único, véase por ejemplo el esquema de Mintzberg² sobre esta cuestión:

- **Cabeza visible de la organización:** Como consecuencia de su autoridad formal, el directivo representa a la organización en actos y aspectos de índole social y legal. Este papel se ejerce en múltiples actividades que van desde la firma de documentos hasta participar en actos sociales y ceremonias oficiales.
- **Líder:** Influencia y guía a los subordinados para asegurarse que están motivados para conseguir las metas establecidas. El papel de líder penetra y se relaciona con todas las actividades del directivo.
- **Enlace:** Establecimiento y mantenimiento de una red de enlaces y relaciones con individuos o grupos fuera de la unidad organizativa sobre la que tiene competencia como directivo.

- **Monitorizador:** Recogida y procesamiento de información de muy variadas fuentes, y con objetivos diversos como son la identificación de problemas y oportunidades, y la comparación de procesos internos y externos de la organización.
- **Diseminador:** Difusión a otros niveles de la organización de la información relevante a la que se tiene acceso en tanto que directivo.
- **Portavoz:** Transmisión de los valores e información sobre la organización a las personas y entidades externas a la unidad organizativa sobre la que se tiene competencia.
- **Emprendedor:** Iniciar y diseñar cambios planificados para aprovechar las oportunidades de mejorar la situación presente.
- **Manejo de disturbios:** Enfrentar y gestionar las crisis y conflictos repentinos, debidos a causas y sucesos imprevistos (pérdida de algún subordinado clave, conflictos de personal, huelgas, etc.)
- **Distribución de recursos:** Reparto de dinero, personal, equipamiento, servicios, etc. de acuerdo con las prioridades y estrategias que se establezcan.
- **Negociador:** Participación clave en negociaciones con sindicatos, grupos de personal, contratos con clientes y/o proveedores importantes, etc. En general y sobre todo en aquellas negociaciones que impliquen un compromiso sustancial para la organización.

Decir que los esquemas de evaluación de la excelencia empresarial, como el Malcom Baldrige y el EFQM, asumen que la autoridad formal y el liderazgo son coincidentes.

Así pues, este es un asunto complejo. Boyett J describe, a partir de escritos de varios autores, las principales diferencias que se han señalado en la literatura entre un directivo normal y un directivo líder³:

DIRECTIVOS	LÍDERES
Hacen correctamente las cosas.	Hacen las cosas correctas.
Se interesan por la eficiencia.	Se interesan por la efectividad.
Administran	Innovan
Se centran en los programas y las estructuras.	Se centran en las personas

Confían en el control.	Confían en la confianza.
Organizan y se proveen de personal	Alinean gente con una dirección.
Hacen hincapié en las tácticas, estructuras y sistemas.	Hacen hincapié en la filosofía, en los valores de la esencia y en los objetivos.
Tienen una visión a corto plazo.	Tienen una visión a largo plazo
Preguntan cómo y dónde.	Preguntan qué y por qué
Aceptan el status quo.	Desafían al status quo.
Se centran en el presente.	Se centran en el futuro.
Tienen su mirada en el mínimo aceptable	Tienen su mirada en el horizonte.
Desarrollan procesos y horarios detalladamente.	Desarrollan visiones y estrategias.
Buscan la previsibilidad y el orden.	Buscan el cambio.
Evitan riesgos	Buscan riesgos.
Motivan a la gente a ajustarse a los estándares.	Incitan a la gente a cambiar
Utilizan la influencia de posición-a-posición (superior-a-subordinado).	Utilizan la influencia de persona-a-persona.

Necesitan que otros obedezcan.	Incitan a los otros para que les sigan.
Funcionan bajo normas organizacionales, regulaciones, políticas y procedimientos.	Funcionan al margen de normas, regulaciones, políticas y procedimientos.
Les han dado el puesto.	Toman la iniciativa de liderar.

Tabla 2. Diferencia entre gestor y líder. Fuente: Boyett J *et al*, 1999.

RASGOS Y CONDUCTAS DEL LÍDER

Los estudios sobre liderazgo, con definición de teorías y modelos específicos, empezaron a tomar cuerpo en el segundo tercio del siglo XX.

Desde una perspectiva actual los diversos modelos explicativos del liderazgo que se han ido produciendo se complementan, pudiendo ser considerados visiones parciales de una realidad más compleja

Los primeros intentos para poder identificar a los líderes se centraron en la búsqueda de determinadas características personales diferenciadoras. (rasgos físicos; de personalidad; relacionados con la inteligencia; relacionados con la consideración social; relacionados con la tarea o el trabajo o relacionados con la relación social con los demás). Sin embargo, no fue posible refrendar empíricamente ninguno de los modelos propuestos.

A pesar de su escaso refrendo empírico se siguen produciendo hoy día listados de características o rasgos determinantes de un liderazgo efectivo.

El segundo tipo de enfoque para entender el liderazgo lo asocia a una determinada conducta, considerando a los rasgos o características como factores predisponentes, no determinantes.

MODELOS DE LIDERAZGO BASADOS EN EL COMPORTAMIENTO

Los modelos de liderazgo que se basan en el comportamiento, desarrollando además instrumentos para medir la presencia de los diversos estilos, fueron los estudios de la Universidad de Ohio y de la Universidad de Michigan, realizados casi simultáneamente, y la formulación/resumen que realizaron Blake y Mouton, muy popular y extensamente utilizada como herramienta docente en los programas de desarrollo de liderazgo en los años 60 y 70. Vamos a ver brevemente las aportaciones esenciales de estos modelos:

- **El modelo de la Ohio State University.** Distinguió cuatro estilos de liderazgo combinando niveles altos y bajos de dos dimensiones de la conducta del líder:

en relación al trabajo y en relación a las necesidades de los subordinados.

El modelo de la Ohio State University no fue completamente corroborado empíricamente, pero la distinción entre actividades técnicas (en relación al trabajo) y humanas (en relación a las personas) así como la relevancia de las necesidades del grupo, fueron aportaciones que se han incorporado a las formulaciones de modelos posteriores

- **El modelo de la Universidad de Michigan.** El modelo de la Universidad de Michigan define dos dimensiones de comportamiento semejantes a las del modelo de Ohio, siendo más efectivos los líderes en los que predomina el comportamiento “centrado en el empleado”; una hipótesis que no se vio refrendada con resultados empíricos
- **La cuadrícula gerencial de Blake y Mouton.** Contempla dos dimensiones: “orientación a la producción” y “orientación a las personas”, claramente derivadas de los estudios anteriores y definidas de manera semejante, siendo un resumen de las aportaciones de los modelos de explicación del liderazgo basados en el comportamiento.

MODELOS DE LIDERAZGO BASADOS EN LA TEORÍA DE LA CONTINGENCIA

Ante la insuficiencia de los modelos basados en el comportamiento para explicar el liderazgo efectivo surge una nueva oleada de modelos, inspirados en la llamada Teoría de la Contingencia.

La idea básica de los modelos basados en la contingencia es que el liderazgo efectivo surge de la interacción con el grupo y la situación en que se ejerce, y depende de su consistencia con esta; de forma que no hay rasgos ni conductas universalmente mejores que otras. A cada grupo y situación corresponde un estilo más efectivo. A continuación vamos a detallar los diferentes tipos de modelos de este apartado:

- **Modelo del Continuum Autocrático-Democrático:** Expresa la conducta del líder en función del área de libertad y participación que se da al grupo liderado.

Si bien los autores del modelo Autocrático-Democrático afirman explícitamente que no hay un estilo igualmente efectivo en todas las ocasiones, los estudios empíricos se centraron en los estilos extremos, encontrando más satisfacción en los subordinados cuando el estilo del líder era democrático.

- **Modelo del camino-meta.** El complejo modelo del camino-meta tuvo gran aceptación en medios académicos, pero menos en el ámbito empresarial, probablemente por la difícil visualización de su aplicación práctica

El modelo del camino-meta basa la efectividad del líder en su capacidad para motivar a los subordinados. Motivación que resulta de las percepciones (expectativas, instrumentalidades,

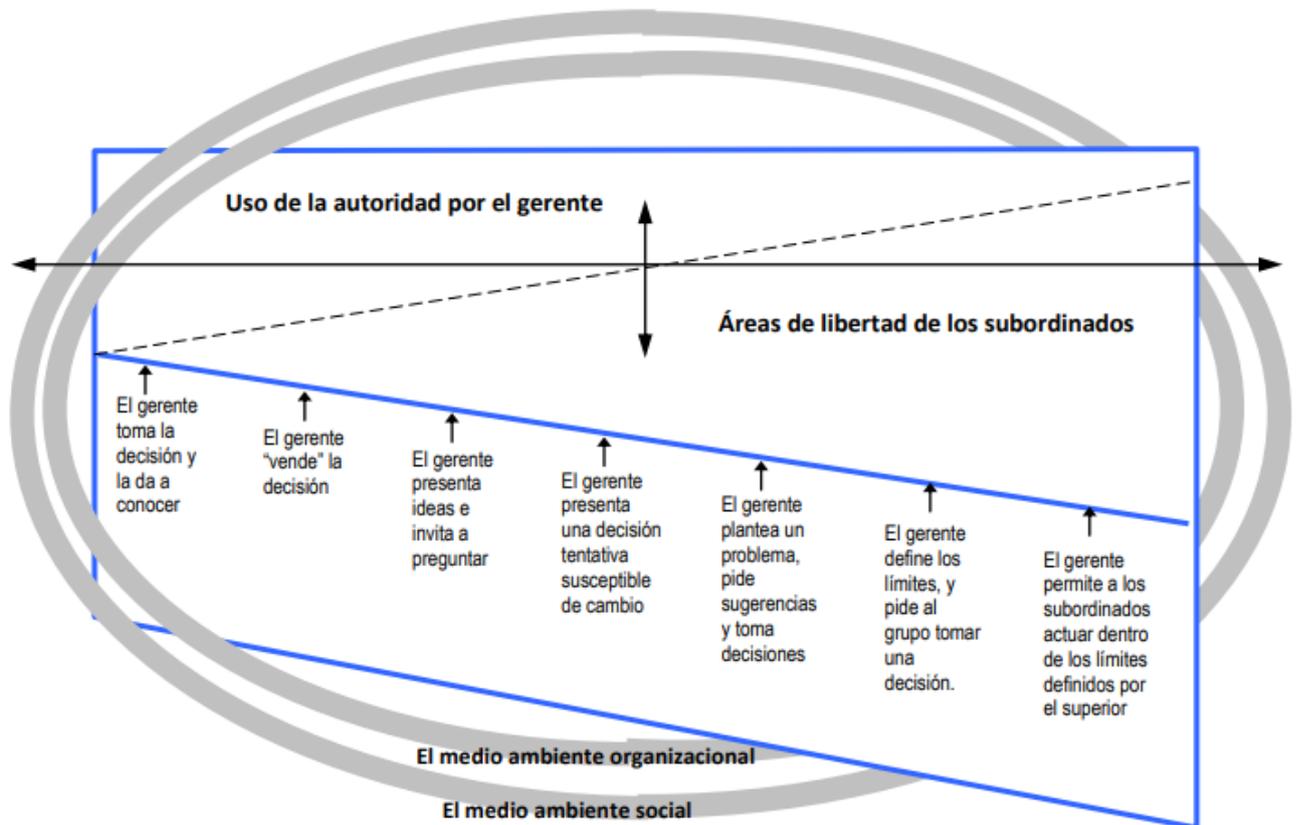


Figura 1. Esquema del continuum autocrático-democrático como modelo de liderazgo. Adaptado de: Tannenbaum R *et al*, 1973⁴.

valencias) de los propios subordinados, moduladas por tres tipos de contingencias: características del medio laboral, características propias de los trabajadores, y conducta del líder.

El modelo del camino-meta ha tenido varias versiones, cada vez más complejas sobre todo en cuanto a número de variables contingentes a tener en cuenta.

- **Modelo de liderazgo situacional:** El modelo de liderazgo situacional tuvo desde su aparición una gran aceptación en medios empresariales.

El principal, prácticamente único, factor de contingencia del modelo de liderazgo situacional es el grado de madurez de los subordinados, al cual debe adaptarse el estilo del líder.

El grado de madurez de los subordinados depende de varios factores y es diferente según la tarea u objetivo de que se trate.

Combinando niveles alto y bajo en las dimensiones de comportamiento que proponen los modelos basados en la conducta, se distinguen cuatro estilos de liderazgo:

- **Directivo.** Caracterizado por alta conducta de tarea y baja conducta de relación. El líder define qué hacer, cómo y cuándo. La opinión de los subordinados y el apoyo a sus necesidades de relación no son importantes.

- **Persuasivo.** Alta conducta de tarea y también alta conducta de relación. El líder define lo que hay que hacer, pero también tiene en cuenta las opiniones y necesidades de los subordinados, a los que apoya y convence.
- **Participativo.** Baja conducta de tarea y alta conducta de relación. Las decisiones se toman de forma conjunta. El líder apoya y facilita las iniciativas y participación de los subordinados.
- **Delegador.** Baja conducta de tarea y baja conducta de relación. El líder no se inmiscuye y delega toda responsabilidad en los seguidores.

La madurez de los subordinados se define en función de su motivación, responsabilidad y competencia, pudiendo tener niveles diferentes de madurez frente a tareas y objetivos diferentes:

- **M4** - El más alto. Corresponde a individuos altamente motivados, y dispuestos y capaces de asumir responsabilidades.
- **M3** - Individuos con capacidad pero sin deseo de hacer lo que el líder les pide.
- **M2** - Individuos con deseo pero sin capacidad para hacer lo que el líder les pide.
- **M1** - El más bajo. Corresponde a individuos desmotivados, no predispuestos a asumir responsabilidad alguna y sin formación ni experiencia sobre las tareas de que se trate.

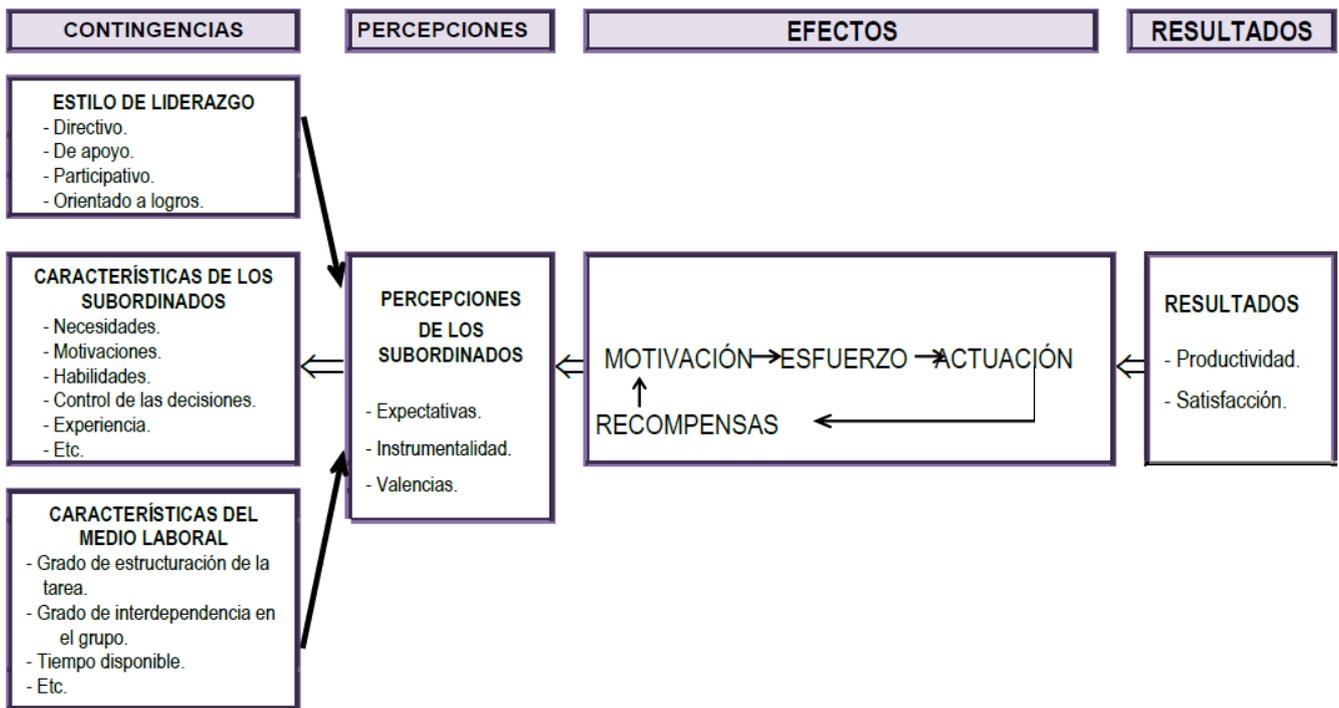


Figura 2. Esquema simplificado del modelo camino-meta. Fuente: Saturno PJ, 2008.

En la figura 3 se resume este modelo.

Según el modelo de liderazgo situacional, el líder más efectivo sería aquel que es capaz de adaptar su estilo al grado de madurez de los subordinados. La forma de utilizar este modelo será como sigue:

1. Determinar la tarea u objetivo que se quiere hacer o conseguir.
2. Determinar el nivel de madurez del grupo en relación a esta tarea u objetivo.
3. Determinar el estilo más efectivo que corresponde a esta situación y actuar en consecuencia. En el esquema de la figura 4, este estilo es el que se encuentra en la curva de los estilos de liderazgo, al trazar una línea vertical desde el nivel de madurez de que se trate.

Este modelo es uno de los que más se ha puesto en práctica y más estudios hay:

La formulación del modelo de liderazgo situacional se acompañó de un cuestionario para medir el estilo predominante y la efectividad potencial (capacidad de adaptación potencial) del líder.

El cuestionario para la valoración del estilo y capacidad potencial de adaptación de los líderes tiene un alto nivel de validez facial y parece que también consistencia interna y cierta validez de construcción y de criterio. Sin embargo, la validación empírica del modelo ha estado en parte lastrada por la falta de un instrumento de medición de la madurez de los subordinados, un concepto clave del modelo

Con posterioridad han ido apareciendo otros modelos e ideas de gran interés en torno al liderazgo, como veremos a continuación, pero el modelo de liderazgo situacional sigue siendo útil al menos para la autoevaluación y la reflexión

sobre el estilo de liderazgo y la capacidad que se tiene de adaptación a situaciones diferentes.

LOS TRES CAMBIOS FUNDAMENTALES EN EL ROL DEL LÍDER ACTUAL.

- **De estratega a visionario:** El líder actual debe tener un mayor componente emocional centrándose más en desarrollar una visión adecuada que en diseñar planes de acción detallados.
- **De “comandante” a “narrador de historias”:** El líder actual debe tener habilidades para “contar historias” que den respuesta a las inquietudes de los seguidores y los alinee con la visión de la organización.
- **De arquitecto de sistemas a agente de cambio y “sirviente”:** El líder actual debe procurar desarrollar las capacidades de iniciativa y desarrollo de ideas de los subordinados. Deben ser un agente de cambio que “sirva” a los subordinados fomentando su creatividad y aprendizaje, y reconociéndoles su poder y autoridad.

LIDERAZO EN LAS INSTITUCIONES SANITARIAS

Los servicios de salud tienen unas ciertas peculiaridades como organización que deben ser tenidas en cuenta a la hora de adaptar cualquiera de los modelos de gestión y ejercicio del liderazgo.

- **Configuración estructural:**

Mintzberg distingue cuatro tipos de lo que llama *configuraciones estructurales* de las organizaciones en

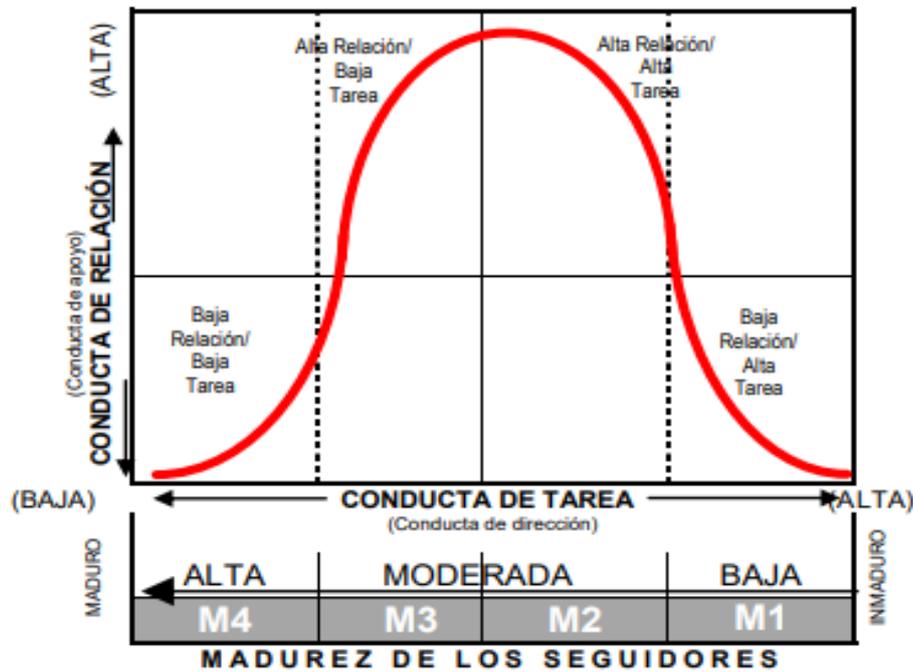


Figura 3. Esquema del modelo liderazgo situacional. Adaptado de: Hersey P et al, 1977.⁵

función de unos ciertos parámetros básicos de diseño de las mismas:

- el principal *mecanismo de coordinación*;
- el *elemento o parte fundamental* de la organización
- el *tipo de centralización/descentralización* que corresponde.

Las instituciones sanitarias responden a organizaciones descritas como “Burocracia profesional”.

En esta configuración estructural, el principal *mecanismo de coordinación* es la normalización de las habilidades, y la *parte fundamental de la organización* es el “núcleo de operaciones”, donde se produce el producto o servicio que da sentido a la organización. Según Mintzberg, en la “burocracia profesional” los miembros del núcleo de operaciones intentan de forma natural minimizar la influencia de los administradores, tanto directivos como analistas, sobre su trabajo, por lo que fomentan y trabajan más a gusto con una descentralización tanto vertical como horizontal en la toma de decisiones. Otras configuraciones estructurales se caracterizan en cambio por ser congruentes con un funcionamiento centralizado, o con grados diversos de descentralización vertical u horizontal.

Este mismo aspecto distintivo de las organizaciones sanitarias es lo que otros autores llaman “profesionalismo” de la organización. Los profesionales controlan los inputs, procesos y outputs clave de la organización, de forma que, debido a la complejidad y la importancia del trabajo que realizan, generalmente se les concede unos niveles muy altos de autonomía. En los llamados “momentos de la verdad” (aquellos en los que se realiza el servicio que requiere el paciente) la supervisión de los directivos es inexistente, y sin embargo es en esos momentos en los que se deben de hacer notar los valores de la organización, y es

de esos momentos de los que dependerá la reputación de la institución.

En esta misma línea, diversos autores apuntan a las diferencias en la llamada “mentalidad del gestor” y la “mentalidad clínica”, formadas ambas a través de una determinada y diferente educación, experiencia y proceso de socialización. En general el foco de atención y la responsabilidad en la mentalidad clínica es el paciente individual, mientras que para la “mentalidad del gestor” es la organización; los clínicos están acostumbrados y entienden mejor las relaciones de autoridad horizontales relacionadas con la profesión y la tarea que realizan, mientras que los gestores entienden mejor y ejercen relaciones de autoridad verticales, relacionadas con el grado de autoridad del puesto que se ocupa en la organización. Si no tenemos en cuenta estas diferencias, es relativamente frecuente una situación de incomunicación y/o incomprensión mutua entre gestores y profesionales en las instituciones sanitarias.

Por todo ello (configuración estructural de burocracia profesional, “profesionalismo” de los servicios que se ofrecen, “mentalidad clínica” congruente con la responsabilización individual), la mayoría de los estudios sobre liderazgo en los servicios de salud sugieren la superioridad en este contexto de los estilos participativo y delegativo, mayoritariamente bajos en conducta de tarea, implicando un amplio grado de autonomía en los subordinados. Al mismo tiempo, la madurez en relación a las habilidades para tareas concretas en los profesionales de la salud es quizá más obviamente situacional que en otros tipos de organizaciones.

Como puede verse, también desde el punto de vista de sus peculiaridades, al hablar de servicios de salud cobra de nuevo total relevancia el concepto del *empowerment* como un rasgo deseable de la forma de gestionarlos, conclusión a la que parece llegarse a través de múltiples teorías,

esquemas y razonamientos. En el lenguaje paradójico de la ciencia de la complejidad, el líder de las instituciones sanitarias debe ser capaz de: indicar la dirección sin formular directivas; liderar a través de servir a los liderados; ejercer la autoridad sin controlar; y limitar la autonomía profesional respetándola.

- **Misión y valores de los servicios de salud:**

Los servicios de salud implican generalmente en su misión y valores un componente de responsabilidad social que es conveniente no olvidar.

El énfasis exclusivo en aspectos economicistas y financieros puede perjudicar el objetivo final, la misión en sí, de los servicios de salud en relación a la satisfacción de las necesidades sanitarias y la elevación del nivel de salud de la población.

Hay autores que cuestionan práctica y éticamente la asunción de que desde el punto de vista de la gestión la provisión de servicios de salud no es diferente de la provisión de otro tipo de servicios.

BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

1. Saturno PJ: Análisis del liderazgo en los servicios de salud. Manual del Master en gestión de la calidad en los servicios de salud. Módulo 9: DIAGNOSTICO ORGANIZACIONAL Unidad temática 42 Universidad de Murcia, 2008. ISBN: 978-84-8371-759-2008. Depósito legal: MU-1660-2008
2. Yukl G: Leadership in organization. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1994, 1ª Ed. Cap. 1.
3. Boyett HJ, Boyett J: Lo mejor de los Gurús. Gestión 2000. Barcelona 1999. Cap 1.
4. Tannenbaum R, Schmidt W: How to choose a leadership pattern. Harvard Business Review 1973; 51 (3): 162-180.
5. Hersey P, Blanchard KH: Management of Organizational Behavior: Utilizing Human Resources. Prentice Hall. Englewood Cliffs, 1977.

SISTEMAS DE CALIDAD. NORMAS DE CERTIFICACIÓN Y DE ACREDITACIÓN Y MODELOS NO NORMATIVOS: JOINT COMMISSION, EFQM, NORMAS ISO. INDICADORES DE GESTIÓN CLÍNICA.

Autor: Daniel Párraga García, Belén Ontañón Nasarre, Jose Miguel Comino Cáceres

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

Palabras clave: ISO, Acreditación, Indicadores

INTRODUCCIÓN

La gestión de la calidad comienza con la implantación de un sistema de calidad para la organización, cubriendo toda su actividad y siguiendo unas guías o estándares.

Se entiende como sistema de calidad la estructura organizativa establecida para regir y actualizar el conjunto de responsabilidades, procesos, acciones y recursos que exige la gestión de la calidad. Los sistemas de calidad que se implantan en los laboratorios clínicos se ajustan, en general, a la ley vigente, a normas internacionales o a modelos no normativos. La aplicación de los modelos tiene gran utilidad como mecanismo de seguimiento en los procesos que se evalúan y en la detección de problemas. Estos problemas se someten a ciclos continuados de mejora. Los modelos se diferencian entre sí en cuanto a los objetivos de la evaluación, los requisitos que se pretenden evaluar y la metodología empleada en esta.

NORMAS DE CERTIFICACIÓN Y DE ACREDITACIÓN. NORMAS ISO

Son modelos por los cuales puede optar el laboratorio clínico de forma voluntaria para implantar un sistema de calidad. Las normas son publicadas por el Organismo Internacional para la Estandarización (ISO), aceptadas por la Unión Europea (*European Norm* [EN]) y por España (Unificación de Normativas Españolas [UNE]). Cuando un laboratorio implanta un modelo normativo de gestión de la calidad, puede solicitar el reconocimiento de una entidad externa que audita y concede un sello de calidad. Estas son las normas que pueden emplear los laboratorios clínicos para implantar un sistema de calidad; en general, existen dos esquemas:

- **Certificación del sistema de calidad**
- **ISO 9001:2015. (Anterior versión en 2008)**

Es una norma de certificación que contempla la gestión de la calidad.

No es específica de los laboratorios clínicos, aunque muchos de ellos optan por esta norma para implantar un modelo de calidad, generalmente como paso previo a la implantación de un sistema normativo de acreditación.

La Asociación Española de Normalización (AENOR) certifica a los laboratorios clínicos según esta norma. En la Tabla 1 se expone el índice con los aspectos que contempla esta norma.

1. Alcance del Sistema
2. Referencias normativas
3. Términos y definiciones
4. Contexto de la Organización 4.1. Organización y su entorno 4.2. Las necesidades y expectativas de las partes interesadas 4.3. Alcance del sistema de Gestión de Calidad 4.4. Sistema de gestión de Calidad
7. Soporte 7.1 Recursos 7.2 Competencia 7.3 Concienciación 7.4 Comunicación 7.5 Información documentada
8. Operaciones (Realización del producto) 8.1 Planificación y control operacional 8.2 Interacción con los clientes y otras partes interesadas (compras- contratos) 8.3 Preparación Operacional 8.4 Control de procesos 8.5 Diseño y desarrollo 8.6 Ejecución / Implementación 8.7 Control de provisión externa de bienes y servicios (compras).
9. Evaluación del desempeño 9.1 Seguimiento, medición, análisis y evaluación 9.2 Auditorías Internas 9.3 Revisión por la dirección
10. Mejora 10.1 No conformidades y acciones correctivas 10.2 Mejora continua

Tabla 1. Índice de la norma ISO ISO 9001:2015

● **Acreditación del sistema de calidad y de la competencia técnica**

La Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) es el único organismo autorizado en España que acredita a los laboratorios según las siguientes normas:

- **UNE-EN-ISO 17025 (2017)**

Es una norma de acreditación que afecta a la gestión de la calidad y los requisitos técnicos de los laboratorios de ensayo y calibración. No es específica de los laboratorios clínicos y, por tanto, no cubre algunos aspectos particulares que afectan a la calidad del proceso analítico en este ámbito.

- **UNE-EN-ISO 15189 (2023)**

Es una norma de acreditación específica para los laboratorios clínicos.

La primera edición fue publicada en 2003. Segunda edición 2007. En junio de 2013 se publicó la tercera edición de la UNE-EN-ISO 15189 en español (en inglés, en 2012). En diciembre de 2022 se publicó la edición vigente, traducándose al español en enero de 2023.

Incluye los requisitos de gestión de la calidad, los requisitos técnicos y los requisitos médicos que deben cumplir los laboratorios clínicos para obtener el reconocimiento externo de su competencia técnica para la realización de análisis. En la Tabla 2 se muestra el índice con los ítems que contempla esta norma:

1 Objeto y campo de aplicación
2 Referencias normativas
3 Términos y definiciones
4 Requisitos generales
4.1 Imparcialidad
4.2 Confidencialidad
4.3 Requisitos relativos a los pacientes
5 Requisitos estructurales y de gobernanza
5.1 Entidad legal
5.2 Director del laboratorio
5.3 Actividades del laboratorio
5.4 Estructura y autoridad
5.5 Objetivos y políticas
5.6 Gestión del riesgo
6 Requisitos de los recursos
6.1 Generalidades
6.2 Personal
6.3 Instalaciones y condiciones ambientales
6.4 Equipamiento
6.5 Calibración y trazabilidad metrológica del equipamiento
6.6 Reactivos y materiales consumibles
6.7 Acuerdos de prestación de servicios
6.8 Productos y servicios proporcionados externamente
7 Requisitos del proceso
7.1 Generalidades
7.2 Procesos preanalíticos
7.3 Procesos analíticos o de análisis

7.4 Procesos postanalíticos
7.5 Trabajo no conforme
7.6 Control de datos y gestión de la información
7.7 Quejas
7.8 Planificación de la continuidad y preparación para emergencias
8 Requisitos del sistema de gestión
8.1 Requisitos generales
8.2 Documentación del sistema de gestión
8.3 Control de documentos del sistema de gestión
8.4 Control de registros
8.5 Acciones para los abordar riesgos y las oportunidades de mejora
8.6 Mejora
8.7 No conformidades y acciones correctivas
8.8 Evaluaciones
8.9 Revisiones por la dirección
Anexo A Requisitos adicionales para los análisis realizados cerca del paciente (POCT)
Anexo B Comparación entre las Normas ISO 9001:2015 e ISO 15189:
Anexo C Comparación entre las Normas ISO 15189:2012 e ISO 15189:2022(este documento)

Tabla 2. Índice de la norma ISO 15189:2023

- **ISO 22870:2016**

La norma ISO 22870 está prevista para ser utilizada junto con la norma ISO 15189. Contiene los requisitos específicos aplicables a todos los análisis realizados junto al paciente o *Point-of-Care Testing (POCT)*, siempre y cuando se efectúen dentro de un hospital u organización sanitaria.

Tras la publicación de la norma 15189:2023, se incorporan a esta los ítems contemplados en la norma ISO 22870:2016.



Figura 1. Relación entre los requisitos de las normas de certificación (ISO 9000) y acreditación (ISO 17025 y 15189). Tomado de: González Hernández A, 2019.

MODELOS NO NORMATIVOS

Los laboratorios clínicos pueden optar también por modelos no normativos a la hora de implantar un sistema de calidad. No son específicos para ellos y generalmente son modelos supralaboratorio, ya que suelen implantarse en organizaciones sanitarias más amplias, como hospitales. Tras la implantación de alguno de estos modelos, el

laboratorio o el hospital pueden solicitar el reconocimiento externo mediante la auditoría correspondiente. Otros modelos no permiten la obtención de un reconocimiento externo y se emplean exclusivamente como herramienta para la mejora, sin la pretensión de un sello de calidad, como imagen para el cliente.

- **Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations (JCAHO)**

La JCAHO es una organización norteamericana que emplea un modelo basado en estándares para la acreditación de centros sanitarios (Figura 2). Considera el laboratorio clínico como una parte integral de la organización hospitalaria y no un sistema aparte. Tiene una larga trayectoria de aplicación en Estados Unidos, y actualmente existen centros sanitarios acreditados en más de 30 países, entre ellos España. Generalmente se opta, de forma voluntaria, por implantar un sistema de calidad, según *The Joint Commission*, para todo el hospital, red de centros de salud u otros centros sanitarios.

Cada uno de los estándares incluye varios elementos de medición, cuya valoración se emplea en la evaluación de la documentación y en la auditoría que realiza el organismo acreditador.

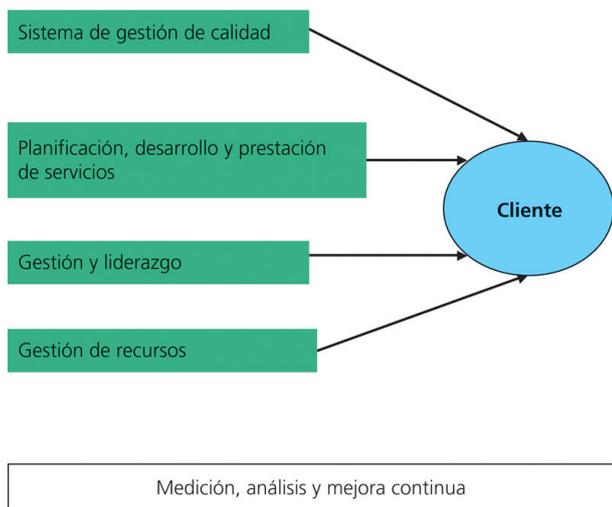


Figura 2. Organización de los estándares de *The Joint Commission*. Tomado de: González Hernández A, 2019.

- **Modelo europeo de calidad total (European Foundation for Quality Management [EFQM])**

Es un modelo basado en la participación de todos sus empleados, que pretende el éxito a largo plazo, en una continua mejora de sus procesos, y el beneficio de todos mediante la satisfacción del cliente y el cumplimiento de su responsabilidad con la sociedad.

No proporciona ningún programa de acción, ni un conjunto de herramientas de mejora, ni un instrumento de motivación ni un conocimiento completo de la calidad total. Proporciona una forma de entender la calidad total, una guía para el autodiagnóstico, y puede ser una herramienta para estructurar las áreas de mejora.

Las ideas esenciales son el cliente, la gestión con datos, la búsqueda de problemas y mejora continua, la comparación con los mejores, la participación o implicación de todos, la

formación, el compromiso y el liderazgo de la dirección. Los criterios y la puntuación máxima que puede obtener cada uno de ellos se presentan en un mapa (Figura 3).



Figura 3. Mapa con los ítems a contemplar en la EFQM. Tomado de: <http://www.efqm.es/>

Como se puede observar, el modelo EFQM consta de 9 criterios de evaluación: 5 criterios agentes (criterios 1–5) y 4 criterios resultados (criterios 6–9), cada uno de los cuales consta a su vez de varios subcriterios.

Los criterios agentes indican cómo debería actuar un centro en el que esté implantado un sistema de gestión de calidad total, y los criterios resultados reflejan lo que el centro está logrando. En la Tabla 3 consta la definición de cada uno de los 9 criterios que componen el modelo.

Criterio 1. Liderazgo Cómo los directivos y mandos intermedios desarrollan y facilitan la consecución de la misión y la visión, desarrollan los valores necesarios para alcanzar el éxito a largo plazo e implantan todo ello en la organización mediante las acciones y los comportamientos adecuados, implicándose personalmente para conseguir que el sistema de gestión de la organización se desarrolle e implante.

Criterio 2. Política y estrategia Cómo implanta la organización su misión y visión mediante una estrategia claramente centrada en todos los grupos de interés y apoyada por planes, objetivos, metas y procesos relevantes.

Criterio 3. Personas Cómo gestiona, desarrolla y aprovecha la organización el conocimiento y todo el potencial de las personas que la componen, tanto a escala individual, como de equipos o de la organización en su conjunto; y cómo planifica estas actividades en apoyo de su estrategia y del funcionamiento eficaz de sus procesos.

Criterio 4. Alianzas y recursos Cómo planifica y gestiona la organización sus alianzas externas y sus recursos internos en apoyo de su estrategia y del eficaz funcionamiento de sus procesos.

Criterio 5. Procesos Cómo diseña, gestiona y mejora la organización sus procesos para apoyar su política y estrategia y para satisfacer plenamente, generando cada vez más valor, a sus clientes y otros grupos de interés.

Criterio 6. Resultados en clientes Qué logros está alcanzando la organización en relación con sus clientes externos.
Criterio 7. Resultados en personas Qué logros está alcanzando la organización en relación con las personas que la integran.
Criterio 8. Resultados en la sociedad Qué logros está alcanzando la organización en la sociedad.
Criterio 9. Resultados clave Qué logros está alcanzando la organización en relación con el rendimiento planificado.

Tabla 3. Tipos de criterios, criterios y definición de éstos. Adaptado del modelo *European Foundation for Quality Management*.

Conviene destacar que hay una íntima relación entre criterios: el criterio resultados en clientes (criterio 6) tiene una relación muy estrecha con el criterio procesos (criterio 5), el criterio resultados en personas (criterio 7) con el criterio personas (criterio 3) y el criterio resultados clave (criterio 9) con los criterios política y estrategia, y recursos (criterios 2 y 4, respectivamente).

Este modelo no surgió propiamente como modelo de calidad, sino que era el modelo que seguían las empresas que concurrían a la convocatoria anual del premio instaurado por la EFQM, y que se comprobó que era de gran utilidad para conseguir un elevado nivel empresarial. El Club de Excelencia en la gestión concede a la empresa un sello, con la puntuación obtenida, como reconocimiento al modelo de calidad implantado.

A escala internacional, existen premios de este tipo en Estados Unidos (Premio Nacional *Malcolm Baldrige*) y Japón (Premio *Deming*).

- **Otros**

- **Seis Sigma**

Es un modelo de calidad no específico de los laboratorios clínicos, aunque es ampliamente utilizado como herramienta de aseguramiento de la calidad del proceso analítico. Surge a partir de los sistemas de gestión de calidad total.

Está orientado al cliente y emplea una metodología para la eliminación absoluta de defectos en los procesos, cuantificándolos como defectos por millón (DPM).

Se centra en los CTQ (*critical to quality*), o aspectos esenciales para la calidad percibida por el cliente.

El Seis Sigma propone una metodología de mejora de procesos y resolución de problemas, un conjunto de herramientas que se aplican en un proceso estructurado en cinco fases (DMAIC): definición del proyecto (D), medición de su capacidad (M), análisis de los resultados (A), mejora del proceso determinando la relación causaefecto (I) y control para asegurar que lo conseguido se mantenga una vez que se hayan implantado los cambios (C).

Nivel en sigma	DPMO	Rendimiento
6	3.40	99.9997%
5	233	99.98%
4	6210	99.3%
3	66807	93.3%
2	308537	69.15%
1	690000	30.85%
0	933200	6.68%

Tabla 4. Nivel de sigma, Defectos por millón (DPMO) y % de rendimiento. Adaptado de: <https://www.pdcahome.com/4466/calcular-el-nivel-sigma-del-proceso/>

- **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**

Es una organización internacional, con sede en Estados Unidos, que diseña, elabora y recomienda estándares y guías de buenas prácticas para los laboratorios clínicos en todas sus disciplinas o áreas de conocimiento. El CLSI dispone de toda una serie de documentos como ayuda a los laboratorios en la implantación de un sistema de gestión de la calidad (www.clsi.org), que contempla todos los documentos necesarios para cumplir requisitos de gestión ISO 9001/ISO 15189.

INDICADORES DE GESTIÓN CLÍNICA

- **Atributos de un buen indicador**

- **Validez**

Un indicador será válido si identifica aquellas situaciones en las que la calidad puede mejorarse. La sensibilidad del mismo dependerá de su capacidad para detectar todos los casos en los que haya un problema de calidad, así como las variaciones del fenómeno estudiado en función de las acciones de mejora puestas en marcha. Será específico si identifica sólo los casos en donde hay un problema de calidad, por lo tanto, no variará el resultado del indicador salvo que varíe el fenómeno estudiado. Existen diferentes tipos de validez:

1. Validez para usarse como indicador de calidad. Debería responder afirmativamente a la pregunta: ¿Mide calidad y sirve para monitorizar e identificar situaciones en las que la calidad asistencial puede mejorarse?
2. Validez facial. Debería responder afirmativamente a la pregunta: ¿Se entiende su sentido e importancia sin muchas explicaciones?
3. Validez para sensibilidad. Debería responder afirmativamente a la pregunta: ¿Identifica todos los casos en los que hay problemas de calidad?

4. Validez para especificidad. Debería responder afirmativamente a la pregunta: ¿Identifica solo los casos en los que hay problemas de calidad?

- **Fiabilidad**

El resultado del indicador será reproducible para los mismos casos y situaciones cuando es medido por observadores diferentes. Lo que exige necesariamente condiciones idénticas de medida y de los elementos de medida. Debería responder afirmativamente a la pregunta: ¿Es interpretado siempre de la misma manera por todos los evaluadores?

- **Utilidad para la mejora de la calidad**

Debe ser útil para la gestión de la calidad en el nivel dentro del sistema de salud en el que vaya a ser utilizado, para conseguir que las actividades de mejora se puedan llevar a cabo. Debería responder afirmativamente a la pregunta: ¿Es apropiado para el nivel de responsabilidad de quienes valoran sus resultados?

● **Tipos de indicadores**

- **Centinel.** Un solo caso denota problema. Se debe de medir con un sistema de vigilancia. Ejemplos: mortalidad materna, casos de polio.
- **Número absoluto.** N° de eventos que se miden por unidad de estudio. No tiene denominador. Ejemplos: n° de intervenciones por semana, tiempo puerta-aguja en Infarto Agudo de Miocardio (IAM).
- **Proporción y porcentaje.** El numerador mide la ocurrencia del indicador en un grupo de casos que es el denominador. Ejemplos: % de pacientes hipertensos controlados, % de pacientes que esperan más de 30 minutos para ser vistos.
- **Tasa.** Proporción o porcentaje por unidad de tiempo. Ejemplos: tasa anual de complicaciones, tasa de cobertura
- **Media.** Promedio de una serie de mediciones de una variable cuantitativa. Ejemplos: medida de tiempo de espera antes de ser visto en una consulta, estancia media.
- **Ratio o razón.** Cociente entre dos variables o media de medición en cada caso de múltiples variables cualitativas simultáneamente. El numerador no está incluido en el denominador. Ejemplos: n° de defectos por documento interconsulta, n° de FRCV (actor de riesgo cardiovascular) indagados por paciente.
- **Compuesto o índice (IDEX).** Resumen o agrupación de varios indicadores específicos. Ejemplos: cobertura de *screening* de cáncer, tasa de problemas de calidad percibida.

● **Metodología para elaborar un buen indicador**

- Enunciado: describe la actividad o suceso a monitorizar.
- Definición clara de los términos usados en el indicador, para asegurar una alta fiabilidad. Comoquiera que el indicador normalmente consta de un numerador y de un

denominador, siempre es necesaria una reflexión acerca de qué ha de contener el numerador y qué el denominador.

- Identificación del tipo de indicador según gravedad, tipo y resultado del suceso monitorizado.
- Fundamento que explica la relevancia del indicador para el problema a monitorizar (validez lógica), incluyendo las fuentes bibliográficas utilizadas.
- Descripción de la población diana en la que se mide el indicador.
- Fuente de datos (historia clínica, bases de datos, etc.).
- Factores responsables: identificando los factores que pueden explicar las posibles variaciones del indicador.
- Datos existentes, haciendo constar si hay datos conocidos sobre el indicador, externos y del propio centro (estándares).

● **Clasificación de los indicadores**

- **Atendiendo a la gravedad del suceso monitorizado**
 1. Indicador centinela: mide un suceso lo bastante grave e indeseable como para realizar una revisión individual de cada caso que se produzca (p.ej.: *éxitus* de la madre durante el parto).
 2. Indicador basado en un índice o proporción: mide un suceso que requiere revisión detallada cuando la proporción de casos no alcanza un umbral previamente establecido como aceptable. (p.ej.: n° de apendicectomías en blanco/total de apendicectomías).
- **Según el tipo de suceso monitorizado**
 1. Indicador de estructura: representa los medios humanos, los equipamientos y los recursos financieros, y se puede expresar de manera absoluta o de manera relativa, p.ej. Número de médicos en un hospital vs. Número de médicos por 1000 habitantes.
 2. Indicador de proceso: mide la actividad desarrollada de forma directa o indirecta, debe incluir criterios de adecuación consensuados o basados en la evidencia científica disponible (p.ej.: porcentaje de pacientes con adecuada preparación intestinal en cirugía colo-rectal).
 3. Indicador de resultados: mide si hemos conseguido o no lo que pretendíamos con las actividades realizadas durante el proceso. Podemos hablar de resultados intermedios (p.ej. tasa de infección del lugar quirúrgico) y de resultados finales (p.ej. índice de mortalidad).
- **En función del resultado del suceso monitorizado**
 1. Indicador positivo: se basa en un suceso considerado deseable, considerando los conocimientos científicos actuales (p.ej.: porcentaje de mejoría de pirosis en la cirugía antirreflujo).
 2. Indicador negativo: basado en sucesos considerados no deseables (p.ej.: tasa de infección nosocomial).

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. AENOR: Normalización y Certificación. Conceptos básicos. AENOR, Madrid 1993, 2ª ed.
2. Norma UNE-EN ISO 9000-2000: Sistemas gestión de la calidad Fundamentos y vocabulario. AENOR, Madrid, 2000.
3. Norma UNE-EN ISO 9001:2000. Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos. AENOR Madrid 2000.
4. European Foundation for Quality Management: Autoevaluación. Directrices para el sector Público: Salud EFQM, Bruselas, 1995.
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. Universidad de Murcia. 2008.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 3ª ed. Barcelona: Elsevier España. 2019.

ENLACES DE INTERES

- <http://www.jcaho.org/>
- <https://enac.es>
- <http://www.efqm.es/>
- www.clsj.org

BLOQUE III

SESIONES DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

CITOGENÉTICA

Autor: Irene González Martínez

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

Palabras clave: Cromosomas, cariotipo, FISH

INTRODUCCIÓN

Desde la última mitad del siglo XX se ha producido un gran progreso en el conocimiento sobre el material genético humano. A mediados de los años 50, Joe Hin y Albert Levan establecieron el número y la estructura de los cromosomas humanos. Desde ese momento, las técnicas para la caracterización del cariotipo humano inician un continuo desarrollo en cuanto a su poder de resolución y eficacia.

Hasta el año 1970, los cromosomas se teñían de forma uniforme, por lo que las parejas de los diferentes cromosomas se ordenaban por su tamaño y parecido morfológico. En el 1971, se desarrollaron técnicas que tiñen los cromosomas en bandas claras y oscuras.

En 1969 comienza la era FISH y posteriormente en 1983 se desarrolla la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que da pie a todo el desarrollo de la genética molecular. Este capítulo se va a centrar en la citogenética que es la rama de la genética que estudia la estructura, función y comportamiento de los cromosomas.

- **Cromatina:**

El ADN del núcleo en interfase se encuentra descondensado y acomplejado con proteínas (ADN:proteínas, 1:2) y recibe el nombre de cromatina. Las principales proteínas de la cromatina son las histonas. Son proteínas de carácter básico (muy ricas en lisina y arginina), que empaquetan y ordenan el ADN en unidades llamadas nucleosomas. Las histonas se unen a los grupos fosfato del ADN y son proteínas muy conservadas evolutivamente. El nucleosoma es una unidad repetitiva de 200 pb y consta de dos partes:

- **Core:** octámero de histonas (2 moléculas de H2A, H2B, H3 y H4) + 146 pb ADN. El ADN da dos vueltas alrededor del octámero formando una hélice levógira.
- **Linker:** resto de ADN (30-40pb) que une cada octámero de histonas con el siguiente.

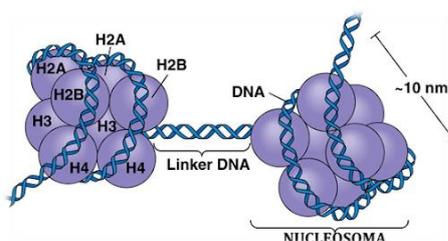


Figura 1. Esquema de nucleosoma. Adaptado de: Pearson Education, 2012.

El empaquetamiento del ADN con histonas produce una fibra de cromatina de 10 nm de diámetro en forma de collar de perlas que condensa el ADN de 6 a 7 veces.

La fibra de 30 nm se origina por el enrollamiento continuo de la fibra de 10 nm dando lugar a un solenoide constituido por 6-7 nucleosomas por vuelta y compacta el ADN unas 100 veces.

La cromatina se encuentra de dos formas en el núcleo en interfase: eucromatina y heterocromatina y fueron originalmente llamadas así por su diferente respuesta a la tinción.

- **Eucromatina (tiñe débilmente):** es mayoritaria en el núcleo en interfase. Se trata de cromatina parcialmente descondensada y distribuida por todo el núcleo. Debido a su bajo grado de compactación es transcripcionalmente activa y se replica de forma temprana.
- **Heterocromatina:** no altera su nivel de compactación a lo largo del ciclo celular estando muy condensada durante la interfase y por ello es transcripcionalmente inactiva. Representa el 10% de la cromatina del núcleo en interfase y contiene secuencias altamente repetitivas de ADN (forma parte de los centrómeros y telómeros).

- **Cromosomas:**

A partir de la fibra de 30 nm, se van sucediendo niveles adicionales de compactación hasta llegar al máximo grado en el cromosoma metafásico. Los cromosomas constan de dos cromátidas hermanas (estructuras duplicadas) unidas por el centrómero. Existen un conjunto de proteínas que contribuyen al mantenimiento de la estructura de los cromosomas condensados y regulan la expresión de los genes: topoisomerasa II y proteínas SMC (cohesinas y condensinas).

- **Cariotipo:**

El cariotipo hace referencia a la disposición ordenada de los cromosomas según su forma, tamaño, posición del centrómero y patrón de bandas. Es específico de cada especie y en el caso de los humanos existen un total de 46 cromosomas, 22 pares de cromosomas homólogos o autosomas, en los que cada par procede de un progenitor y un par de cromosomas sexuales. De esta manera hombres y mujeres se diferencian en el par sexual, las mujeres tienen dos cromosomas X mientras que los hombres tienen un cromosoma X y un cromosoma Y.

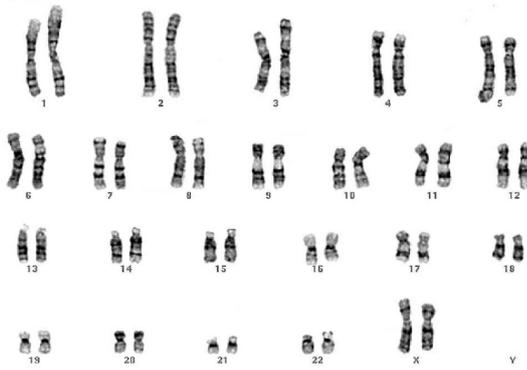


Figura 2. Cariotipo con 22 pares de cromosomas homólogos y 2 cromosomas X. Disponible en: Figura 1. Imagen de un Cariotipo Normal de Mujer, con formula... (n.d.). <https://www.researchgate.net/>

Con base en el criterio de tamaño y posición del centrómero los cromosomas pueden ser de cuatro tipos:

- **Metacéntricos:** el centrómero se sitúa en el centro del cromosoma, formando dos brazos muy similares. Son los cromosomas 1, 3 19 y 20.
- **Acrocéntricos:** el centrómero está muy desplazado. En el caso de los humanos se observan dos pequeñas estructuras similares a palillos de tambor denominados satélites. Son los cromosomas 13, 14,15, 21 y 22.
- **Submetacéntricos:** el centrómero está desplazado, formando dos brazos, uno largo y otro corto. Son los cromosomas 2, 4, 5, 6-12, 16, 17 y 18.
- **Teloméricos:** si carece totalmente de brazo corto. En el caso de los humanos no existe este tipo de cromosomas.

- Alteraciones cromosómicas:

Muchas de las alteraciones cromosómicas provocan anomalías funcionales. La mayoría de estas anomalías tienen su origen en cambios en el número o la posición de los genes y se puede dividir en dos grupos: alteraciones numéricas y alteraciones estructurales. Los cambios en el número de cromosomas dan lugar a una euploidía aberrante y pueden originarse como resultado del fenómeno de no disyunción en la que uno de los cromosomas y su homólogo pasa al mismo polo de la célula. Las Alteraciones estructurales son reordenamientos cromosómicos que implican una rotura de la doble hélice. Las alteraciones que suponen una ganancia o pérdida de material genético (alteraciones no balanceadas) tienen implicaciones fenotípicas para el portador. Algunos ejemplos son:

- **Duplicaciones:** se duplica una parte del cromosoma.
- **Deleciones:** pérdida de una parte del cromosoma.
- **Traslocaciones:** se transfiere una parte de un cromosoma a otro. Existen traslocaciones balanceadas recíprocas en las que se intercambian segmentos de dos cromosomas distintos y no existe pérdida ni ganancia de material genético y no balanceadas.

- **Traslocación robertsoniana:** se produce por la fusión de dos cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22). Estos cromosomas tienen el centrómero muy cerca del extremo final, resultando en un brazo p muy corto. Cuando se produce esta fusión, se pierden los extremos y los dos cromosomas quedan unidos en uno, es por eso que los individuos portadores de este tipo de translocaciones tienen 45 cromosomas en lugar de 46.
- **Isocromosoma:** se origina durante la meiosis o mitosis, cuando la división del centrómero se produce según el plano transversal en vez de vertical. Como consecuencia, uno de los brazos del cromosoma original se pierde y los brazos del isocromosoma resultante son genéticamente idénticos entre sí pero en sentido inverso.

TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

● Técnica de obtención de cariotipo:

Los procedimientos más empleados en el análisis cromosómico recurren a técnicas de cultivo celular in vitro para analizar cromosomas durante la metafase. Esto se debe a que en este estadio del ciclo celular, los cromosomas están más condensados y con una morfología más definida que permite ordenarlos, compararlos y analizarlos.

La muestra requerida para la obtención del cariotipo es diferente según la indicación del estudio. En el periodo postnatal se utiliza sangre periférica. La extracción debe realizarse en tubos de heparina de litio y las células que se cultivan son linfocitos. En el caso de estudios prenatales, el objetivo es estudiar al feto por lo que en estos casos es necesario el cultivo de vellosidad corial, líquido amniótico, sangre de cordón y tejidos fetales en caso de restos abortivos y en estos casos se cultivan fibroblastos. Finalmente, en los estudios de oncohematología como se pretende estudiar al tumor, la muestra más empleada es médula ósea que se obtiene mediante el aspirado de médula ósea en esternón o cresta iliaca. El cultivo de muestras para la realización del cariotipo depende del tipo de sospecha, de esta forma, si la patología es de estirpe mielóide no se utiliza agente mitógeno. Al contrario que si es de estirpe linfóide y en este caso los tiempos de cultivo son más cortos. En el caso de sospecha de mieloma, la técnica citogenética de elección no es el cariotipo ya que el clon neoplásico son las células plasmáticas y estas no se dividen fácilmente.

Los pasos a seguir para obtener el cariotipo son: una primera etapa de siembra y cultivo, detención de la división celular en metafase, extensión de las muestras en portaobjetos, envejecimiento y tinción.

A continuación, se detallan las etapas necesarias para la obtención del cariotipo en muestras de sangre periférica:

1. Se siembran alrededor de 3 gotas en un medio enriquecido y se incuban a 37°C durante 72 horas. La estimulación de la división celular se logra con la adición de un factor mitogénico como es la fitohemaglutinina (PHA).
2. Se agrega una solución de colchicina al medio para detener la división celular y evitar que las células

completan la mitosis. La colchicina impide la formación del huso acromático de tal forma que no se puede avanzar en las etapas de mitosis. También afecta a la condensación de los cromosomas. Por ello, hay que tener en cuenta que, a pesar de que el tiempo al que las células están expuestas al inhibidor del huso acromático es proporcional al índice metafásico, una exposición prolongada resulta en la reducción de la longitud de los cromosomas. Por tanto, es necesario encontrar un equilibrio para obtener un mayor número de metafases con los cromosomas lo suficientemente elongados para obtener una buena resolución.

3. A continuación, se realiza un choque hipotónico con KCl que produce que las células se hinchen, hemoliza los hematíes y ayuda a la dispersión de los cromosomas dentro de la célula.
4. Los cromosomas deben ser fijados y limpiados con una solución de carnoy. El carnoy es una proporción 3:1 de metanol (deshidrata y fija los cromosomas) y acético (degrada la membrana citoplasmática).
5. Para la extensión en los portaobjetos se añade un par de gotas de carnoy y se dejan caer unas gotas de muestra procesada desde una altura de 30 cm.
6. Se dejan en la estufa durante al menos una semana para que se deshidraten, ya que esto favorece la tinción posterior de las muestras.
7. La tinción más empleada para el bandeado cromosómico es el bandeado G que da como resultado cromosomas con bandas oscuras (heterocromatina) y claras (eucromatina) aunque también existen otros tipos de bandeado con diferentes aplicaciones. En el estudio al microscopio hay que contar por lo menos 20 metafases de portas distintos para que la valoración sea significativa.

La técnica de obtención del cariotipo en prenatal, es ligeramente diferente a la descrita utilizando sangre periférica sobre todo en la etapa de siembra y cultivo. Para la obtención de fibroblastos, el cultivo dura tres semanas y requiere sucesivos pasos de tripsinación y cultivo.

El cariotipo por bandeado G permite detectar un gran número de alteraciones cromosómicas. Sin embargo, estas alteraciones tienen que tener un tamaño como mínimo de entre 5-10 pb dependiendo de la resolución del cariotipo. La necesidad de trabajar con células en división, a veces una morfología cromosómica deficiente, y la resolución son factores limitantes para un estudio completo y preciso de los cromosomas que a veces debe complementarse con otras técnicas citogenéticas como la hibridación in situ fluorescente o FISH.

- **Indicaciones del cariotipo:**

La aplicación del cariotipo es poder comprobar si existen alteraciones cromosómicas en un individuo que expliquen su fenotipo o patología. Las indicaciones más frecuentes para su realización son:

- **Posnatal.** En el periodo perinatal se solicita por síndromes dismórficos, malformaciones y genitales ambiguos; en la infancia suele solicitarse en caso de fallo del crecimiento, retraso mental, alteraciones de la diferenciación sexual y pubertad retrasada; en el adulto por casos de esterilidad, abortos de repetición y familiares con anomalías cromosómicas.
- **Prenatal.** Ante cribados del primer trimestre de riesgo, la indicación general suele ser la realización del test prenatal no invasivo (TPNI) ya que se trata de un método no invasivo con alto valor predictivo. Sin embargo, en el caso de que esta prueba apoyara la posible presencia de una alteración cromosómica, siempre hay que confirmarla estudiando el cariotipo completo del feto, habitualmente mediante la obtención de líquido amniótico. En caso de cribados del primer trimestre de muy alto riesgo, se suele indicar directamente la realización de una prueba invasiva, en este caso, por las semanas de gestación se realizaría una biopsia corial. También está indicado la realización del cariotipo en mujeres que han tenido embarazos previos con alteraciones cromosómicas y abortos de repetición.
- **Oncohematología.** El objetivo no es el estudio del individuo como en los casos anteriores sino el estudio del tumor. El análisis citogenético de las células tumorales ha revelado la presencia de alteraciones cromosómicas clonales en más de 30.000 neoplasias humanas. El conocimiento de la alteración cromosómica asociada a un determinado diagnóstico permite hacer un seguimiento de la evolución de la enfermedad, valorar la respuesta a tratamiento y detectar y cuantificar la enfermedad mínima residual.

- **FISH: Hibridación in situ fluorescente**

La hibridación in situ fluorescente (FISH) permite la detección de secuencias específicas del ADN mediante la hibridación de una sonda de ADN monocatenario marcada con una sustancia fluorescente sobre su secuencia complementaria en el genoma. Es una técnica de citogenética molecular que combina la microscopía de fluorescencia con el método molecular de hibridación "in situ", se puede realizar en metafase o células en interfase que no se dividen, y puede detectar anomalías cromosómicas con una resolución de 150 a 900 kb dependiendo del tamaño de la sonda.

La técnica de FISH se inicia con una desnaturalización de la muestra de ADN, con lo que se separan las hebras complementarias de la estructura en doble hélice. A continuación, se le añade la sonda específica marcada con un fluorocromo que se añadirá al ADN de la muestra en la zona diana. Finalmente la señal emitida por la sonda se observa en el microscopio de fluorescencia.

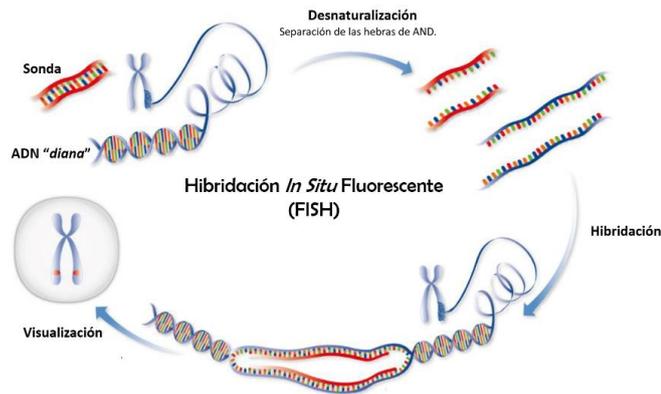


Figura 3. Esquema de hibridación in situ fluorescente (FISH). Disponible en: ¿Qué es el fish?. Soluciones de diagnóstico para los laboratorios - Sysmex España. (n.d.). <https://www.sysmex.es/>

La preparación de las extensiones se hace igual que para la obtención de cariotipo, siendo aconsejable que los portaobjetos a hibridar estén realizados al menos 24 horas antes.

1. En primer lugar, se realiza un pretratamiento mediante lavados con alcohol en un gradiente creciente de concentración (fijar) y con sales para permeabilizar las células.
2. Se añaden las sondas necesarias para el estudio.
3. Desnaturalización para abrir la doble hélice del ADN mediante calor 74°C 3 min.
4. La hibridación se realiza dejando a 37°C overnight.
5. Los lavados post-hibridación se realizan para eliminar el ruido de fondo o artefactos que pueden quedar tras la hibridación. Es importante realizar los lavados de manera cuidadosa para que los portaobjetos no estén expuestos durante mucho tiempo a la luz.
6. Contraintinción para poder visualizar la fluorescencia, el colorante más utilizado es el DAPI.
7. Visualización en el microscopio de fluorescencia.

Se pueden diferenciar tres tipos de sondas FISH comerciales: sondas de secuencia única, sondas centroméricas y sondas de pintado cromosómico.

- **Sondas de secuencia única:** son específicas para un locus determinado. Mediante estas sondas podemos detectar reordenamientos estructurales de genes o de regiones cromosómicas concretas, además de identificar deleciones y duplicaciones submicroscópicas. La aplicación de estas sondas requiere tener la sospecha previa de la región a estudiar. Dentro de las sondas de secuencia única, encontramos sondas específicas de translocaciones que pueden ser de dos tipos: sondas de fusión, que son específicas para cada uno de los genes involucrados en la translocación. Sondas break-apart que están dirigidas contra las regiones que flanquean el punto de ruptura de un mismo gen.

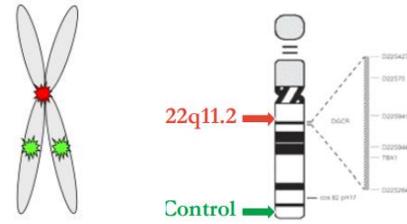


Figura 4. Ejemplo de sonda de secuencia única. Elaboración propia.

- **Sondas centroméricas:** contienen secuencias complementarias de las secuencias altamente repetitivas que se encuentran en los centrómeros de los cromosomas. Como pueden utilizarse sondas de diferentes colores, cada cromosoma puede ser marcado de manera distinta, con lo que se puede averiguar si un individuo tiene alteraciones numéricas.
- **Sondas de pintado cromosómico:** son colecciones de sondas de un tamaño reducido, cada una de las cuales se hibrida a una secuencia diferente a lo largo de todo un cromosoma o de uno de sus brazos.

● Indicaciones de FISH:

La técnica FISH permite la detección de anomalías cromosómicas más allá de la capacidad de resolución de la citogenética convencional. Siempre que se disponga de sondas, permite identificar material extracromosómico de origen desconocido y complementa a la citogenética convencional en aquellas situaciones en las que no ha podido realizarse el diagnóstico con el cariotipo.

En cuanto a sus principales ventajas, no requiere de células en división y permite el uso de muestras congeladas, tiene una mayor resolución y una sensibilidad y especificidad altas. Sin embargo, presenta los inconvenientes de que no es una técnica de screening (hay que saber lo que se busca), está limitada a la disponibilidad de sondas, no pueden detectarse muchas alteraciones simultáneamente y presenta un elevado coste.

APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS CITOGENÉTICAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES CROMOSÓMICAS

● Diagnóstico de aneuploidías

- **Síndrome de Down:** es una afección producida por la existencia de una copia extra del cromosoma 21. El 95% de los casos se producen por una trisomía 21 debido a una no disyunción meiótica, habitualmente en el óvulo. El 4% se debe a una traslocación robertsoniana entre el cromosoma 21 y otro cromosoma acrocéntrico que normalmente es el 14 o el 22. Por último, un 1% de los pacientes presentan un mosaico, con cariotipo normal y trisomía 21. Aunque las características fenotípicas son reconocibles incluso en el feto, es necesario la realización de un cariotipo para el diagnóstico. Las características de este síndrome son: retraso

madurativo y de crecimiento, macroglosia, hipotonía, piel seca, estreñimiento y presentan unas características fenotípicas muy reconocibles (puente nasal aplanado, ojos almendrados rasgados hacia arriba, manchas de brushfield, un solo pliegue en la palma de la mano etc). Además, un 30-60% de los SD presentarán una cardiopatía. Más de un 50% de estos niños tienen problemas oculares y auditivos.

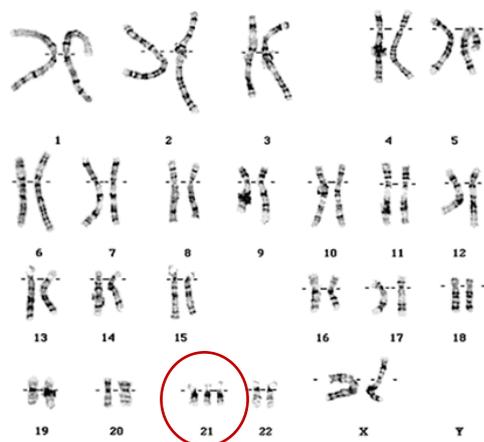


Figura 5. Cariotipo de paciente con trisomía 21.

Disponible en: Cariotipo del Síndrome de Down. (n.d.).

<https://www.urv.cat/>

- **Síndrome de Edwards:** es un síndrome polimalformativo, consecuencia de una trisomía 18. Su frecuencia se calcula entre 1/6000-1/13000 nacidos vivos. El 95-96% de casos corresponden a trisomía completa producto de no-disyunción, siendo el resto trisomía por traslocación. Parece que es necesaria la duplicación de dos zonas, 18q12-21 y 18q23 para que se produzca el fenotipo típico de S. de Edwards, teniendo la zona, 18q12.3-q21.1 fuerte influencia en el retraso mental. Las características fenotípicas más habituales son: retraso mental y de crecimiento, microcefalia, fontanelas amplias, occipucio prominente, posiciones de 1º y 4º dedos sobre 2º y 5º, pies equinos, cardiopatías y malformaciones renourológicas. Mortalidad del 95% en el primer año de vida.

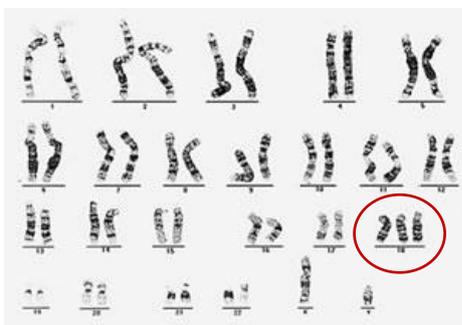


Figura 6. Cariotipo de paciente con trisomía 18. Disponible en: Mena J, 2006.

- **Síndrome de Patau:** es un síndrome polimalformativo grave, con una supervivencia que raramente supera el año de vida, debido a la existencia de tres copias del cromosoma 13. La prevalencia se estima aproximadamente entre 1:12.000 y 1:29.000 nacidos vivos. El 75% de los pacientes presentan una trisomía

de todo o de una gran parte del cromosoma 13. Al igual que otras trisomías humanas, se debe a una no disyunción cromosómica durante la meiosis, principalmente en el gameto materno. Aproximadamente un 20% de casos se deben a traslocaciones, siendo la t(13q14) la más frecuente. También se han descrito casos de mosaicismo (5%) de la trisomía 13, estos pacientes presentan un amplio rango fenotípico, que puede ir desde las malformaciones típicas hasta un fenotipo cercano a la normalidad. Los hallazgos clínicos más frecuentes son las anomalías de las estructuras de la línea media que incluyen holoprosencefalia (con diferentes grados de desarrollo incompleto de los nervios olfatorios y ópticos), labio leporino con o sin fisura palatina (60-80% de los pacientes) y onfalocelo, el 80% de los pacientes presentan malformaciones cardíacas. También son comunes las anomalías de las extremidades, alteraciones en la visión, malformaciones renales, criptorquidia en varones y útero bicornes en las mujeres. El retraso psicomotor grave es prácticamente constante y es evidente desde los primeros meses de vida.

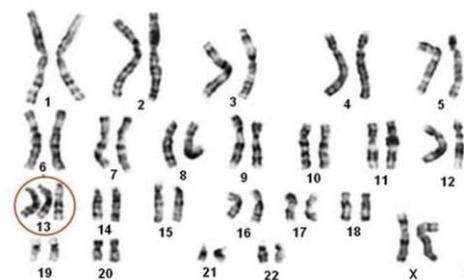


Figura 7. Cariotipo de paciente con trisomía 13.

Disponible en: Guasch, M. (2021, November 10). Qué es el síndrome de Patau o trisomía 13. <https://madreshoy.com>

- **Diagnóstico de anomalías del desarrollo sexual**

Dentro de las anomalías del desarrollo sexual destacan las debidas a anomalías en los cromosomas sexuales.

- **Síndrome de Klinefelter (SK):** es una forma de hipogonadismo masculino debido a esclerohialinosis testicular con atrofia y azoospermia, ginecomastia, y tasa elevada de gonadotropinas. Tiene una incidencia de 1 de cada 1000 varones nacidos. El SK ocurre sólo en varones y se debe a la presencia de un cromosoma X extra. Un 75% de estos individuos tienen un cariotipo 47,XXY. Aproximadamente un 20% son mosaicos cromosómicos, siendo el más frecuente el 46,XY/47,XXY. En aproximadamente la mitad de las ocasiones se debe a errores en la meiosis I paterna, y el resto a errores en la meiosis I ó II materna. Fenotípicamente, son individuos altos y delgados, con piernas relativamente largas. Físicamente no hay ningún rasgo anómalo hasta la pubertad, en que pueden objetivarse signos de hipogonadismo. En los adultos la característica más común es la esterilidad.

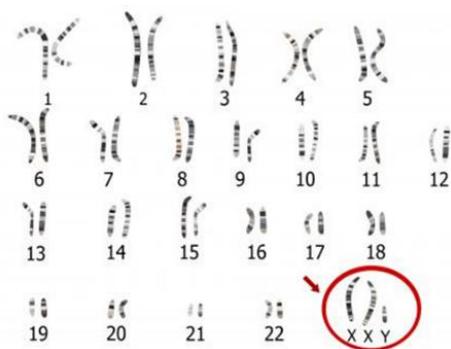


Figura 8. Cariotipo de paciente cariotipo 47,XXY.
 Disponible en: Talise, M. (2022, September 21). Diagnóstico del Síndrome de Klinefelter. Inicio. <https://www.webconsultas.com/>

- **Síndrome de Turner (ST):** es una entidad sindrómica caracterizada por talla baja, disgenesia gonadal y unos hallazgos fenotípicos característicos asociados a monosomía parcial o total del cromosoma X. La prevalencia se estima en torno a 1/2500-3000 recién nacidas vivas, aunque hoy se conoce que los fetos 45X0 suponen un 1-1,5% de las concepciones, siendo un 99% abortos espontáneos y un 1% aquellos que sobrevivirían. La hipótesis más aceptada actualmente sobre la causa de esta enfermedad es la pérdida cromosómica en las mitosis iniciales del feto. Generalmente, el cromosoma X materno es el que permanece íntegro en dos tercios de los casos. Existen diferentes fórmulas cromosómicas en el ST: el denominado ST "clásico" o cariotipo 45,X0 (45-50%), mosaicos (45,X0/46,XX) (15- 25%), englobado dentro de la disgenesia gonadal mixta (45,X0/46,XY) (10-12%), con anomalías estructurales en uno de los cromosomas X (10%): cromosoma X en anillo, isocromosoma X, deleciones selectivas. Generalmente los mosaicismos presentan fenotipos más atenuados. El diagnóstico del ST en Pediatría se realiza fundamentalmente en el contexto de talla baja e infantilismo sexual debido a disgenesia gonadal.



Figura 9. Cariotipo de paciente cariotipo 45, X0.
 Disponible en: Cariotipo de Síndrome de Turner. 45X/0 - Researchgate. (n.d.-a). <https://www.researchgate.net/>

• **Diagnóstico de enfermedades onco-hematológicas**

Leucemia mieloide crónica: afecta aproximadamente a 1/100.000 personas y la edad media de aparición es de 56

años. Hasta la llegada de los fármacos actuales, la evolución natural de la enfermedad era la de permanecer en esa fase crónica un periodo de tiempo aproximado de 3 a 5 años, evolucionando posteriormente a una fase acelerada y a una fase blástica. Actualmente gracias a los tratamientos disponibles con inhibidores de tirosin kinasa (Imatinib) permiten que la progresión sea menor del 10%. La característica citogenética más frecuente en LMC es la presencia del cromosoma filadelfia. Una sección del cromosoma 9 y una sección del cromosoma 22 se rompen e intercambian lugares. De esta manera se forma el gen de fusión BCR-ABL en el cromosoma 22 donde se une a la sección del cromosoma 9. La transcripción del BCR-ABL permanece activa continuamente, sin necesidad de ser activado por otras proteínas mensajeras. Este gen codifica la proteína de fusión p210bcr-abl con una elevada actividad tirosina cinasa, que interfiere en varios procesos de control de proliferación en las células neoplásicas.

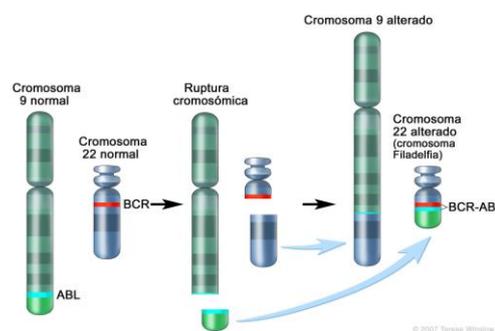


Figura 10. Formación del gen de fusión BCR-ABL. Cromosoma Filadelfia. Imagen disponible en: Diccionario de Cáncer del NCI. Instituto Nacional del Cáncer. (n.d.). <https://www.cancer.gov/>

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Allen EG, Freeman SB, Druschel C, et al. Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. Hum Genet. 2009 Feb;125(1):41-52.
- American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Standards and Guidelines. Genetics in Medicine. 2016.
- Asociación Española de Pediatría. (4 de noviembre 2021). Síndrome de Down (trisomía 21). Mercé Artigas López. Disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/6-down.pdf>
- Asociación Española de Pediatría. (4 de noviembre 2021). Síndrome de Klinefelter. Mercé Artigas López. Disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/8-klinefelter.pdf>
- Asociación Española de Pediatría. (4 de noviembre 2021). Síndrome de Edwards (trisomía 18). Mercé

- Artigas López. Disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/5-edwards.pdf>
- Mena, J., Rodríguez, A., & Córdor, L. (2006). Quistes de Plexos coroideos: Marcadores Ecográficos de Cromosomopatías. *Clínica e Investigación En Ginecología y Obstetricia*, 33(3), 107–109. [https://doi.org/10.1016/s0210-573x\(06\)74095-3](https://doi.org/10.1016/s0210-573x(06)74095-3)
 - Asociación Española de Pediatría. (4 de noviembre 2021). Síndrome de Patau (trisomía 13). Mercé Artigas López. Disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/4-patau.pdf>
 - Asociación Española de Pediatría. (4 de noviembre 2021). Síndrome de Turner. Mercé Artigas López. Disponible en: https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/17_sind_turner_retr.pdf
 - Audí L, Azcona C, Barreiro J, Bermúdez de la Vega JA, Carcavilla A, Castaño LA, et al. Anomalías del desarrollo sexual. Desarrollo sexual diferente. *Protoc diagn ter pediatr*. 2019;1:1-19.
 - Carrasco Salas P, Gómez González C, Prior de Castro C, et al. Estudios genéticos en diagnóstico prenatal. *Rev Lab Clin*. 2019;12(1):27-37.
 - Martínez-Fernández ML, Sánchez-Izquierdo MD, Martínez-Frías ML. Resumen de la evolución de las técnicas de citogenética y genética molecular para la identificación de las alteraciones genéticas del desarrollo embrionario. *Semergen*. 2010;36(9):520-525.
 - Sánchez Herrero A, Hernando Espinilla A, Esteller Beltrán C. Anomalías de la diferenciación sexual: a propósito de un caso. *Rev Lab Clin*. 2019;12(4):175-178.
 - Tamar C, Constanza N, Fonseca DJ. Utilidad de la citogenética en la medicina actual. *Visión histórica y aplicación*. *Acta Med Colomb*. 2008; 33:309-316.

TÉCNICAS BÁSICAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Autor: Jesús Cabanes Madrid, José Manuel Sánchez Zapardiel, Beatriz Hidalgo Calero

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

Palabras clave: Electroforesis, PCR, Sanger

INTRODUCCIÓN

Existen 2 tipos principales de ácidos nucleicos: el ácido desoxirribonucleico o ADN y el ácido ribonucleico o ARN. Ambos están formados por unas unidades estructurales llamadas nucleótidos.

El ADN tiene como función el almacenamiento y la transmisión de la información biológica en las células eucariotas, bacterias y algunos virus, ya que es en su secuencia de nucleótidos donde se especifican tanto las secuencias de nucleótidos de todos los ARN como las secuencias de aminoácidos de todas las proteínas de la célula. El análisis de los genes mediante técnicas moleculares es utilizado, por ejemplo, para la detección de mutaciones (cambios en la secuencia de nucleótidos del material genético) que ayuden al diagnóstico de enfermedades hereditarias o al estudio de la predisposición genética al desarrollo de tumores.

Respecto al ARN, en las células eucariotas y procariontes se pueden encontrar distintos tipos, entre los que destacan (entre los que destacan, pero además hay miRNA, siRNA lncRNA):

- ARN ribosómico: es uno de los componentes estructurales de los ribosomas.
- ARN mensajero (ARNm): son los intermediarios que transportan la información genética desde un gen hasta el ribosoma para sintetizar la correspondiente proteína. Por ello, su análisis puede emplearse para el estudio de la expresión de determinados genes en un tejido concreto.
- ARN de transferencia: son moléculas adaptadoras que traducen la información contenida en el ARN mensajero a secuencias específicas de aminoácidos.
- Otros: micro ARN (miARN), ARN pequeño de interferencia (siARN), ARN de cadena larga no codificante.

También el ARN es el material genético que sirve como almacenamiento y transmisor de la información biológica en algunos virus, por lo que el análisis de ARN también permite diagnosticar ciertas enfermedades víricas.

- **Estructura de los ácidos nucleicos**

Tanto el ADN como el ARN están formados por unas unidades estructurales llamadas nucleótidos. Cada nucleótido que forma parte de un ácido nucleico está formado por 3 componentes: un azúcar de 5 carbonos en su forma

ciclada, un grupo fosfato unido al carbono 5 del azúcar y una base nitrogenada unida al carbono 1 del azúcar. Los nucleótidos del ADN presentan como azúcar la desoxirribosa, mientras que los del ARN presentan la ribosa. Respecto a las bases nitrogenadas, se encuentran predominantemente 5 diferentes: adenina, timina, guanina, citosina y uracilo. Tanto el ADN como el ARN presentan nucleótidos cuya base es la adenina, la guanina o la citosina. Sin embargo, en general, la timina se encuentra solamente en el ADN y el uracilo en el ARN. Solo raramente se encuentran ambas en el otro tipo de ácido nucleico.

Estos nucleótidos sucesivos en el ADN y el ARN se encuentran unidos de forma que el grupo fosfato de un nucleótido está unido al grupo hidroxilo del carbono 3 de la pentosa del siguiente nucleótido, siendo este el llamado enlace fosfodiéster. La posición del fosfato se conoce como 5', y la del grupo hidroxilo del carbono 3 de la pentosa se conoce como 3'. Como todos los enlaces fosfodiéster tienen la misma orientación a lo largo de la cadena nucleotídica, se dice que cada cadena de ácido nucleico presenta una polaridad específica, con extremos 5' y 3' diferenciados.

Respecto a la estructura del ADN en eucariotas concretamente, ésta consiste en 2 cadenas lineales enrolladas alrededor del mismo eje formando una doble hélice. Las bases nitrogenadas de ambas cadenas se encuentran apiladas en el interior de la doble hélice, y los grupos fosfato cargados negativamente quedan hacia el exterior. El principal tipo de interacción entre las 2 cadenas son los puentes de hidrógeno que se establecen entre bases nitrogenadas de ambas cadenas. Concretamente, la adenina interacciona específicamente con la timina en el ADN (y el uracilo en el ARN), y la guanina con la citosina y viceversa.

Por tanto, las dos cadenas que constituyen el ADN son complementarias, es decir, si hay una adenina en una cadena, en la otra se encontrará en la misma posición una timina. Estas dos cadenas son también antiparalelas, es decir, si una presenta una polaridad 5'→3', la otra presenta una polaridad 3'→5'. Cabe destacar una transformación química que puede experimentar el ADN: la desnaturalización. Se trata de la rotura de los enlaces covalentes del ADN cuando se aplica calor o ante valores extremos de pH, lo que provoca el desenrollamiento de la doble hélice y la consecuente formación de 2 hebras sencillas separadas una de la otra. Del mismo modo, se conoce como renaturalización al proceso contrario cuando los valores de pH o de temperatura retornan a la normalidad.

Por otro lado, el ARN está constituido por polímeros de ribonucleótidos que generalmente son de cadena sencilla, aunque puede presentar bucles por apareamiento de bases dentro de la misma cadena. Otra particularidad a destacar es

que los ARN mensajero de eucariotas presentan una caperuza 5', y en su extremo 3' una "cola" de nucleótidos de adenina, característica que se puede aprovechar para su aislamiento.

EXTRACCIÓN DE ADN Y ARN

La mayoría de técnicas de diagnóstico molecular requieren como primer paso el aislamiento del correspondiente ácido nucleico a analizar.

El ácido nucleico puede obtenerse a partir de muestras sólidas, como tejidos o vellosidades coriónicas, o a partir de muestras líquidas, como la sangre o la saliva. Los especímenes de tejidos sólidos deben disgregarse antes de comenzar cualquier procedimiento de extracción. Normalmente, esto se realiza sometiendo el espécimen a fuerzas mecánicas que proporcionen células individuales disociadas con un mínimo de lisis. Para los especímenes de sangre, la muestra debe recogerse junto con el anticoagulante EDTA. La capa resultante de las células mononucleales de sangre periférica (PBMCs) tras la centrifugación se separa y se resuspende en un tampón adecuado para aislar el ácido nucleico deseado.

Una vez obtenida la muestra, el primer paso de cualquier extracción es la lisis celular para liberar el contenido de las células mediante el uso de detergentes o enzimas líticas. A continuación, se han de degradar las proteínas asociadas al ácido nucleico en cuestión mediante el uso de proteasas como la proteinasa K y el ácido nucleico que no se desee extraer mediante el empleo de ADNasas (si se quiere extraer ARN) o ARNasas (si se quiere extraer ADN). Posteriormente se procede a la extracción propiamente dicha. Esta puede realizarse en fase líquida empleando productos como el cloroformo y el fenol con posterior extracción de la fase acuosa y precipitación del ácido nucleico, o en fase sólida, con el empleo de membranas de sílice o de partículas magnéticas, siendo en ambos casos reversible la unión del ADN con estas fases sólidas. En la actualidad existe la automatización de estos procesos para realizar la extracción del material genético.

Por otro lado, el estudio de la expresión génica en eucariotas depende del aislamiento y análisis de los ARNm, teniendo que separar para ello esta fracción de ARN del ARN total. Para ello, se aprovecha la circunstancia de que los ARNm eucariotas tienen una cola de poliadeninas. Una vez extraído el ARN total, se hace pasar por una columna que contiene una cadena de poli-Timinas unido a una fase sólida. El ARNm se une a dicha cadena por la complementariedad entre adeninas y timinas y queda retenido en la fase sólida, mientras que el resto de ARN se eluye. Finalmente, se eluye posteriormente el ARNm. Cabe destacar también que el ARN es más lábil y se degrada rápidamente, por lo que, cuando se desee extraer, se ha de llevar más cuidado y trabajar con material libre de ARNasas.

Una vez llevada a cabo la extracción, la cantidad y la calidad del ADN o ARN obtenido se puede evaluar mediante espectrofotometría. La concentración de ambos ácidos nucleicos se puede determinar midiendo la absorbancia a 260nm, que es la longitud de onda a la que absorben las

bases nucleotídicas. Por otro lado, el grado de pureza se estima mediante las relaciones del valor de absorbancia a 260nm con el de 280nm y con el de 230nm. El valor de A260/280 indica la pureza respecto a las proteínas, puesto que la absorbancia de éstas se aprecia en torno a 280 nm, mientras que el valor de A260/230 refleja la pureza del ácido nucleico con respecto a otros contaminantes como por ejemplo el fenol que se haya podido emplear durante el procedimiento de extracción.

SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La electroforesis es la principal técnica para separar las moléculas de ácidos nucleicos. Con esta técnica se consigue que, al aplicar un determinado voltaje, las moléculas más grandes de ácido nucleico presenten mayor dificultad para pasar a través de los poros de un gel, mientras que las moléculas más pequeñas estén menos impedidas, y por lo tanto migren más rápido.

En un extremo, el gel tiene unas ranuras, llamadas pocillos, donde se colocan las muestras del ácido nucleico. Antes de cargar las muestras, el gel debe colocarse en una cubeta de electroforesis. En esta cubeta es donde se conectan los electrodos positivo y negativo, y su interior se llena con una solución amortiguadora con sales que puede conducir la corriente (tampón Tris-acetato-EDTA TAE). El extremo del gel que tiene los pocillos se coloca hacia el electrodo negativo, y el extremo opuesto se coloca hacia el electrodo positivo. Una vez que el gel esté en la cubeta, las muestras del material genético a analizar se transfieren a los pocillos junto con el tampón de carga que contiene azul de bromofenol y xileno cianol.

A continuación, se aplica un determinado voltaje a la cubeta y así empieza a fluir corriente a través del gel. Como los ácidos nucleicos tienen carga negativa, éstos comenzarán a moverse a través de la matriz del gel hacia el polo positivo. Los fragmentos más cortos de ácidos nucleicos viajarán más rápido a través de los poros de la matriz del gel que los fragmentos de mayor tamaño.

Una vez que los fragmentos se han separado, para poder examinar el gel y saber el tamaño de las bandas que se encuentran en él, se adiciona previamente a cada muestra un compuesto fluorescente que se une al material genético (intercalante) y así, si se coloca el gel bajo luz UV, se podrán visualizar las bandas. Cada banda lo que contiene es un gran número de fragmentos de ADN del mismo tamaño. Además, uno de los pocillos se reserva para un marcador de peso molecular, que es un estándar de referencia que contiene fragmentos de ADN de longitudes conocidas.

Existen principalmente dos tipos de geles que se emplean para la electroforesis: el de agarosa y el de poliacrilamida. Los poros de los geles de agarosa tienen un mayor tamaño que los de los geles de poliacrilamida. Para adecuarse al intervalo de tamaño de las moléculas que van a separarse, también hay que elegir adecuadamente las concentraciones del gel. Por ejemplo, el uso de geles al 0,8% de agarosa son más adecuados para separar moléculas de ADN de mayor tamaño, en el margen de 0,5 a 10 kb. En cambio, los geles

de poliacrilamida se usan para separar fragmentos de ADN más pequeños, ya que presentan mayor poder de resolución.

La electroforesis puede ser empleada para diversas aplicaciones, por ejemplo, para asegurarse de que la amplificación deseada de un fragmento genético realmente ha tenido lugar, o también se emplea en el proceso de secuenciación por el método de Sanger.

AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

● PCR convencional

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR se puede amplificar enormemente el número de copias de un segmento de ADN. El fundamento de la técnica es la repetición cíclica de tres reacciones simples que varían sólo en la temperatura de incubación. Este método emplea principalmente una ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa), grandes cantidades de los 4 nucleótidos y dos oligonucleótidos de cadena sencilla llamados cebadores o *primers*, que son complementarios a secuencias conocidas del ADN diana.

El primer paso es desnaturar por calentamiento a gran temperatura (unos 94-95°C) el ADN nativo de doble cadena para obtener cadenas sencillas.

En el segundo paso, se reduce la temperatura a un valor en el rango de 45-65°C de forma que los dos oligonucleótidos cebadores se hibriden con sus secuencias complementarias en las cadenas opuestas del ADN que se quiere amplificar (temperatura de anillamiento o *annealing*).

El tercer paso es la extensión de la cadena complementaria o elongación. Se trata de sintetizar, a una temperatura de 72°C, una segunda cadena complementaria de nuevo ADN, que se produce al extenderse cada cebador desde su extremo 3' utilizando una ADN polimerasa termoestable. Esta enzima va añadiendo los nucleótidos complementarios a la secuencia de ADN molde, catalizando la formación de los enlaces fosfodiéster que unen a los nucleótidos de una misma cadena. El tiempo de esta fase dependerá de la longitud en pares de bases del amplicón a amplificar.

Por tanto, por cada cebador se sintetiza una nueva cadena, y las propias cadenas de ADN resintetizadas serán moldes de los cebadores para el siguiente ciclo de PCR, por lo que los ciclos repetidos de desnaturación, hibridación del cebador y extensión producirán una acumulación exponencial del ADN.

Dado que las tres reacciones del proceso de PCR tienen lugar en el mismo tubo de reacción y todos los componentes son termoestables, esta técnica es fácil de automatizar. Se ha conseguido utilizando el llamado amplificador de ADN o termociclador.

Esta tecnología posee una gran sensibilidad y se emplea para clonar ADN, en medicina forense, en el diagnóstico de infecciones víricas o en el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas, entre otros.

● PCR en tiempo real

Esta técnica permite obtener la concentración inicial del ADN molde del que se parte y se basa en la detección y cuantificación de la fluorescencia de una sonda, medida en tiempo real a lo largo de los ciclos de PCR. Uno de los métodos más utilizados es el sistema de detección de la sonda TaqMan.

Esta sonda es un oligonucleótido complementario al ADN diana y que contiene un colorante fluorescente indicador en el extremo 5' y un colorante supresor o *quencher* en el extremo 3'. Mientras la sonda está intacta, la proximidad del colorante supresor reduce considerablemente la fluorescencia emitida por el colorante indicador. Cuando la sonda se une a su secuencia diana y comienza la etapa de elongación de la PCR, la actividad 5'-exonucleasa de la polimerasa degradará la sonda y con ello liberará el compuesto fluorescente del supresor. De esta forma, se generará una señal que aumentará en cada ciclo de PCR, y de forma proporcional al número de moléculas iniciales.

● PCR multiplex

Consiste en la amplificación simultánea de distintos fragmentos de ADN utilizando múltiples y diferentes pares de cebadores en una sola reacción de PCR. Los cebadores deben elegirse de forma que no hibriden entre sí y que generen fragmentos de tamaños diferentes para poder identificarlos posteriormente en un gel de electroforesis. Al aumentar el número de fragmentos que se amplifican a la vez, hay que aumentar el tiempo de duración de los ciclos de PCR para asegurar la amplificación de todos ellos. Esta técnica se puede utilizar para el análisis simultáneo de varias mutaciones.

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La secuenciación es el conjunto de técnicas que permiten una caracterización detallada de un gen: el conocimiento del número, naturaleza y orden de los nucleótidos que lo componen.

La determinación de las secuencias de bases de largas cadenas de ADN tiene gran relevancia en la detección de mutaciones del ADN implicadas en diversas enfermedades. Entre las diferentes técnicas de secuenciación, se destaca en el presente capítulo la secuenciación de Sanger.

● Método de secuenciación de Sanger clásico

El método de secuenciación de Sanger, también conocido como método de los didesoxi o de terminación de cadena, se basa en la síntesis enzimática de la cadena complementaria a aquella que se quiere secuenciar, es decir, similar a la etapa de elongación de la PCR.

En una reacción de elongación de PCR convencional, las ADN polimerasas requieren de un cebador, al que van añadiendo los nucleótidos, y de una cadena molde, que es la que dirige la selección de cada nuevo nucleótido. De esta forma, el grupo hidroxilo de la posición 3' libre del cebador

reacciona con el desoxinucleótido entrante formando un nuevo enlace fosfodiéster.

Para la secuenciación de Sanger, lo que se emplea además de estos elementos, son análogos de tipo didesoxinucleótidos, es decir, desoxinucleótidos que carecen también del grupo hidroxilo en la posición 3'. Por tanto, al insertar la ADN polimerasa un didesoxinucleótido en lugar de un desoxinucleótido, se detendrá la elongación de la cadena al no poder formar otro enlace fosfodiéster.

Así, mediante la adición de pequeñas cantidades de un único didesoxinucleótido a un mix de reacción por lo demás igual que una PCR convencional (la ADN polimerasa, el cebador, y los 4 desoxinucleótidos, principalmente) las hebras complementarias sintetizadas van a detener su crecimiento en algunas posiciones en las que normalmente se encontraría el desoxinucleótido análogo al didesoxinucleótido añadido a ese mix de reacción.

Por ejemplo, si al mix de reacción se ha adicionado un didesoxinucleótido de adenina, el resultado es una disolución que contiene una mezcla de fragmentos acabados en un residuo de adenina. Así, se generan un conjunto de fragmentos marcados de una longitud determinada, y su tamaño, al separarlos por electroforesis, es el que nos va a indicar la localización o posición de los residuos de adenina de esa secuencia.

Este procedimiento se repite separadamente para cada uno de los 4 didesoxinucleótidos, cada uno en una calle del gel adyacente, y así la secuencia se puede leer directamente mediante una autorradiografía del gel de electroforesis: los fragmentos de ADN más cortos migran a mayor velocidad, por lo que los más cercanos al extremo inferior del gel representan posiciones de los nucleótidos más cercanos al cebador, es decir, al extremo 5' de la hebra complementaria a la que se está secuenciando.

- **Método de secuenciación de Sanger automatizado**

La secuenciación de ADN fue automatizada mediante una modificación del método de Sanger, en la cual cada uno de los cuatro didesoxinucleótidos utilizados en la reacción fue marcado con una etiqueta fluorescente de diferente color. Con esta tecnología, las 4 reacciones del método anterior se pueden fusionar a la vez en una única reacción. Así, los productos pueden separarse en una sola calle de un gel de poliacrilamida o utilizando electroforesis capilar.

Con un láser, se dirige la luz hacia un segmento horizontal de la parte inferior del gel o en la salida del capilar electroforético. Al pasar los fragmentos marcados con el compuesto fluorescente, se excitan y producen la fluorescencia. Tras pasar a través de cuatro filtros fluorescentes, la luz emitida se recoge en un detector. La identidad del nucleótido terminador de cada fragmento que pasa se identifica por la fluorescencia asociada con él. Asimismo, el orden temporal de las moléculas fluorescentes que pasan se traduce automáticamente en una secuencia lineal de ADN que se almacena en el ordenador (Figura 1).

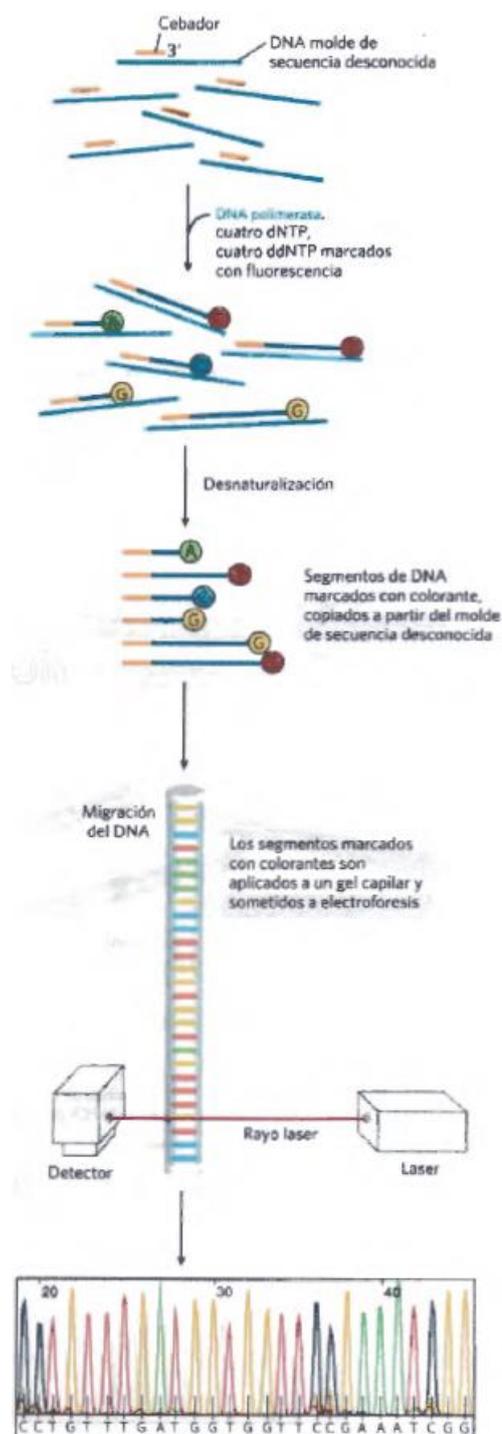


Figura 1. Esquema del método de secuenciación de Sanger automatizado. Tomado de: Nelson D.L., Cox M.M.; 2018.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- González de Buitrago, J.M. Técnicas y Métodos de Laboratorio clínico. 3ª edición. Elsevier Masson; 2010.
- Lodish H., et al. Molecular Cell Biology. 7ª edición. WH Freeman; 2012.
- Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger. Principios de Bioquímica. 7ª Edición. España: OMEGA; 2018.
- Nussbaum R.L. et al. Thompson & Thompson, Genética en Medicina. 7ª ed. Elsevier Masson; 2008
- Rye C. et al. Biology. 1ª edición. Texas: OpenStax; 2016.

BLOQUE IV

SESIONES DE HEMATOLOGÍA

APLICACIONES DEL FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA EN EL LABORATORIO DE HEMATIMETRÍA

Autor: Daniel Gil Alós, María Poza Santaella

Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: frotis sanguíneo, sangre periférica, hematimetría.

INTRODUCCIÓN

El frotis de sangre periférica es un recurso muy empleado en el laboratorio de hematimetría, ya que es una técnica sencilla, barata y rápida que permite validar hemogramas ante alteraciones analíticas tras descartar patologías relevantes desde el punto de vista hematológico.

Para realizar un frotis se debe extender una gota de sangre en un portaobjetos que debe ser teñida para la adecuada visualización de los distintos elementos. Las tinciones más comúnmente empleadas son la tinción de Wright y la tinción de May-Grümwald-Giemsa.

En función de las distintas alteraciones en el hemograma, el frotis de sangre periférica nos puede orientar hacia determinadas patologías según la propia alteración, tal como se irá desarrollando a lo largo del capítulo.

No se hablará de eritrocitosis y de trombocitosis porque, por lo general, la rentabilidad del frotis de sangre periférica es muy escasa en estas situaciones.

ANEMIA

A continuación, se exponen las alteraciones morfológicas en la serie roja más comunes con su descripción y las patologías más comunes a las que se suelen asociar (resumidas en la Tabla 1):

- **Excentrocitos.** Estos hematíes presentan una distribución de la hemoglobina polarizada, de modo que la zona clara no se observa en el centro sino en un extremo (Figura 1A). También se les conoce como “células mordidas” y son características de las crisis hemolíticas del déficit de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.
- **Eliptocitos.** Son eritrocitos con forma alargada y extremos redondeados que son característicos de la anemia ferropénica, especialmente cuando se acompañan de hematíes pequeños (microcitosis) y de coloración pálida debido a un halo central muy amplio (hipocromía) (Figura 1D). También se pueden observar eliptocitos en la eliptocitosis congénita.
- **Dacriocitos.** Son hematíes en forma de lágrima y son típicos de la anemia mieloptísica, de modo que cuando predominan en el frotis suelen sugerir fibrosis medular, especialmente cuando se acompañan de un cuadro leucoeritroblástico (formas inmaduras eritroides y granulocíticas). Ejemplo de esto pueden ser la mielofibrosis primaria o secundaria y la infiltración medular por tumores sólidos.
- **Equinocitos.** Son hematíes con prolongaciones espiculadas regulares a lo largo de su membrana (Figura 1F). Pueden observarse en situaciones de fracaso renal agudo, aunque también son típicos del déficit de piruvato kinasa.
- **Acantocitos.** Son eritrocitos con prolongaciones irregulares y no espiculadas, a diferencia de los equinocitos. Suelen observarse en fallo hepático agudo. También se pueden ver, sin necesidad de presentar anemia, en las neuroacantocitosis (como en el síndrome de McLeod). Sin embargo, puede tratarse de un artefacto en los casos en que se realice la extensión pasadas muchas horas de la extracción sanguínea.
- **Paludismo y otros parásitos.** Algunos parásitos como los causantes de la malaria (*Plasmodium* spp) se introducen en los hematíes y pueden dar imágenes características en su forma de trofozoíto. Se presentan como un anillo con uno o dos puntos dentro de los hematíes (Figura 1C).
- **Drepanocitosis.** La anemia de células falciformes o anemia drepanocítica suele presentar dianocitos y células falciformes que presentan una forma alargada, con extremos apuntados (a diferencia de los eliptocitos)
- **Esferocitos** (Figura 1E). Son eritrocitos que adoptan una forma esférica, de modo que suelen verse más pequeños y más oscuros que los hematíes normales por la pérdida del halo claro central. Pueden observarse en anemias hemolíticas inmunes y en esferocitosis hereditaria.
- **Esquistocitos.** Se presentan como hematíes fragmentados debido a la ruptura de los mismos al pasar por un estrechamiento. Hay determinados esquistocitos que tienen forma de triángulo y otros forma de casco (Figura 1B). Son característicos en las microangiopatías trombóticas (como la púrpura trombocitopénica trombótica o el síndrome hemolítico urémico) o en las hemólisis mecánicas (por malfuncionamiento de válvulas cardíacas o prótesis vasculares).
- **Macroovalocitos.** Son hematíes en forma ovalada y de un tamaño mayor (macrocíticos) que suelen presentarse en la anemia megaloblástica (por déficit de vitamina B12 o de ácido fólico) y lo más característico en esta entidad es que se suele acompañar de hipersegmentación en los neutrófilos (con 6 o más núcleos).

y que pueden adoptar distintas formas en función de su plegamiento sobre sí mismas ("células en barco", "células en avena").

Tipo de célula	Patología relacionada
Acantocitos	Hepatopatía (sdr Zieve), neuroacantocitosis, artefacto
Dacriocitos	Anemia mieloptísica (mielofibrosis, infiltración por tumor sólido) y eritrodiasplasia
Equinocitos	Déficit de PK, insuficiencia renal
Excentrocitos	Déficit de G6PDH
Esquistocitos	MAT (PTT, SHU, SHUa, CID), mecánica
Macroovalocitos	A. Megaloblástica
Dianocitos	A. Ferropénica, talasemias, hemoglobinopatía
Eliptocitos	A. Ferropénica, eliptocitosis congénita

Tabla 1. Correlación entre alteraciones morfológicas en serie roja y patologías más frecuentemente relacionadas. Elaboración propia.

TROMBOCITOPENIA

- **Agregados de plaquetas** (Figura 4B). Ante una trombocitopenia significativa, lo primero que hay que hacer es descartar que no se trate de una falsa trombocitopenia o pseudotrombocitopenia. Esta situación se produce por una agregación de las plaquetas en el tubo tras la extracción, habitualmente desencadenada por la activación plaquetaria por anticuerpos relacionados con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que puede verse en el frotis de sangre periférica como agregados plaquetarios de mayor o menor tamaño. Otra forma de pseudotrombocitopenia es el satelitismo plaquetario, que consiste en la agregación de las plaquetas alrededor de leucocitos (habitualmente neutrófilos). Este falso descenso en la cifra de plaquetas suele corregirse tras realizar la determinación en un tubo que no contenga el anticoagulante EDTA (habitualmente el de citrato sódico).
- **Plaquetas gigantes en la PTI u otras trombocitopenias de origen periférico** (pero no exclusivamente, porque puede ser un rasgo displásico en trombocitopenias centrales). Este dato puede hacerse evidente en el hemograma con un aumento del volumen plaquetar medio (VPM).
- **Plaquetas gigantes con inclusiones en neutrófilos** típico de las macrotrombocitopenias hereditarias asociadas a MYH9).

LEUCOCITOSIS

A continuación, se enumeran causas habituales de leucocitosis (exceptuando las leucocitosis con neutrofilia que se producen en un proceso agudo infeccioso/inflamatorio):

- **Leucemia Mieloide Crónica (LMC)** (Figura 2A). Se trata de una entidad que se caracteriza por presentar todos los precursores granulocíticos en sangre periférica, de modo que es habitual observar en mayor o menor medida: neutrófilos segmentados, neutrófilos cayados, metamielocitos, mielocitos, promielocitos y blastos. Habitualmente debuta como una leucocitosis con neutrofilia que se suele acompañarse de cierto grado de basofilia. Los síndromes mieloproliferativos Philadelphia negativos también pueden cursar con leucocitosis con neutrofilia, aunque la salida de precursores granulocíticos en sangre periférica (mielemia) no suele ser tan llamativa como en la LMC.
- **Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC)**. Se caracteriza por presentar una monocitosis (> 1.000 monocitos/ μ L, o > 10% de monocitos) de forma sostenida durante más de 3 meses, además de rasgos displásicos más o menos marcados en una o más series hematopoyéticas. Además de monocitos maduros, pueden acompañarse de formas más inmaduras como los promonocitos.
- **Leucemias agudas**. Aunque una forma habitual es la leucocitosis con citopenias también es frecuente la presentación en forma de bicitopenia o pancitopenia. Las leucemias agudas se caracterizan por el aumento de blastos que pueden observarse en sangre periférica. La presencia de un 20% o más de blastos en sangre periférica o médula ósea es diagnóstica de leucemia aguda, aunque la detección de blastos en sangre periférica ya nos debe poner en alerta. Las leucemias agudas se pueden dividir comúnmente en **leucemia mieloide aguda (LMA)** y **leucemia linfoblástica aguda (LLA)**.
 - La **LLA-B** se puede presentar con blastos de pequeño tamaño, con cromatina laxa sin nucleolos y escaso citoplasma como suele ser habitual en la edad pediátrica, mientras que en las formas adultas lo más habitual es encontrarse con blastos de mediano tamaño, moderada relación núcleo/citoplasma con un núcleo de cromatina laxa y con nucleolos prominentes y citoplasma amplio sin granulación (Figura 2B). Hay que prestar especial atención al subtipo de LLA madura (o tipo Burkitt), que se caracteriza por presentar blastos de tamaño intermedio con citoplasma hiperbasófilo y abundantes vacuolas citoplasmáticas. La **LLA-T** suele presentar típicamente un núcleo polilobulado (Figura 2C).
 - La **LMA** puede tener una presentación morfológica variable pero lo más habitual es encontrar células blásticas de mediano a gran tamaño con núcleo grande con varios nucleolos y citoplasma amplio con granulación (mieloblastos) (Figura 2E), o blastos sin granulación citoplasmática pero con una relación núcleo/citoplasma y un aspecto nuclear que recuerda al de los monocitos (monoblastos). Hay formas de LMA que cursan con una disposición característica de la cromatina en forma de huella y que suelen

asociar la mutación en nucleofosmina-1 (NPM1) (Figura 2D). Dentro de la LMA hay un subtipo que requiere especial atención porque su diagnóstico precoz e instauración temprana de tratamiento puede cambiar la evolución del paciente de forma muy importante. Este es el caso de la leucemia promielocítica aguda que se caracteriza por presentar células de tamaño grande, con núcleo grande de cromatina laxa, en ocasiones bilobulado (“núcleo en hachazo”) y con intensa granulación citoplasmática, a veces polarizada en un extremo de la célula y que de forma característica puede presentar bastones de Auer (o astillas cuando son muy abundantes) (Figura 2F).

LINFOCITOSIS

La causa más habitual de linfocitosis son las linfocitosis reactivas que aparecen en contexto de procesos inflamatorios agudos, siendo esto especialmente frecuente en los niños. Suelen presentar formas de linfocitos activados con cromatina discretamente más laxa aunque sin nucléolos marcados y citoplasma basófilo y amplio. El ejemplo de esto puede ser la mononucleosis (Figura 4A).

Más allá de esto, es importante en las linfocitosis descartar que se deba a una leucemia linfoblástica aguda (comentada previamente) o a un síndrome linfoproliferativo. Dentro de los síndromes linfoproliferativos identificables en sangre periférica podemos destacar:

- **Leucemia linfática crónica (LLC)** (Figura 3A). Presenta linfocitos de pequeño tamaño, cromatina madura y condensada con aspecto en *grumelée* o “en caparazón de tortuga”, por su tendencia a concentrarse en varios grumos divididos por franjas de cromatina más clara. Tienen una alta relación núcleo/citoplasma (N/C), con núcleo redondeado y citoplasma escaso y sin granulación. Además, típicamente pueden asociar numerosas sombras de Gumprecht (o manchas nucleares), más a mayor linfocitosis, debido a la fragilidad de estos linfocitos que se rompen durante la extensión sanguínea. Para hablar de LLC, deben tener más de 5.000 linfocitos en sangre periférica.
- **Leucemia prolinfocítica B** (Figura 3B). En este caso predominan en sangre periférica la presencia de prolinfocitos, que son células más grandes que los linfocitos normales y que se caracterizan por la presencia de un pequeño nucléolo, habitualmente en posición central, sobre un núcleo con cromatina moderadamente condensada y de bordes regulares. La presencia de una linfocitosis donde los prolinfocitos representan más del 55% de los linfocitos de sangre periférica define la leucemia prolinfocítica B. En caso de ser < 55% y, en el contexto de una LLC, puede tratarse de una LLC en transformación prolinfocítica.

En los síndromes linfoproliferativos nombrados a continuación, la expresión en sangre periférica con linfocitos atípicos no se produce en todos los casos y pueden hacerlo en escasa cantidad como para no llegar a cursar con linfocitosis.

- **Linfoma folicular** (Figura 3C). Cuando este linfoma, originado en el centro germinal del folículo linfoide, se expresa en sangre periférica suele hacerlo con unos linfocitos característicos conocidos como centrocitos. Estas células se reconocen por ser de pequeño tamaño, con elevada relación núcleo/citoplasma y un núcleo de contorno irregular al presentar una hendidura, estrecha y profunda, que atraviesa casi por completo el núcleo. Por este aspecto también recibe el nombre de núcleo “en grano de café”.
- **Linfoma de células del manto** (Figura 3D). Este linfoma originado en linfocitos B de la zona del manto folicular puede tener expresión periférica en una proporción variable. Cuando lo hace, puede mostrar una morfología heterogénea, con células que pueden resultar más características al presentar un tamaño pequeño-mediano, con un núcleo de contorno irregular, invaginado “en boca de pez”, con cromatina intermedia y ocasional nucléolo. También puede mostrar variedades más blásticas, con células de gran tamaño y una alta relación núcleo/citoplasma con cromatina laxa y varios nucléolos, o una variedad pleomórfica con células grandes, núcleo redondeado y escaso citoplasma basófilo.
- **Linfoma de la zona marginal esplénico (con linfocitos vellosos circulantes)** (Figura 3E). Este linfoma presenta expresión en sangre periférica con una frecuencia elevada, por lo que para su diagnóstico puede ser muy relevante la identificación de estos linfocitos atípicos. Son células de pequeño tamaño, aunque mayor que los linfocitos normales y los de la LLC, con un núcleo ovalado o poligonal y cromatina condensada, con un citoplasma basófilo que presenta unas prolongaciones (vellosidades) distribuidas irregularmente, habitualmente polarizadas hacia un extremo de la célula (a diferencia de los tricoleucocitos, descritos más adelante).
- **Micosis Fungoide/Síndrome de Sézary** (Figura 3F). Las células de Sézary son linfocitos de tamaño grande, alta relación núcleo/citoplasma y con un núcleo redondeado u ovalado con bordes replegados y superpuestos que remedan los giros y circunvoluciones del cerebro (de ahí su denominación de “núcleo cerebriforme”). Estas células tienen una cromatina condensada y no presentan nucléolos, así como un citoplasma escaso. Hay una variante de menor tamaño y con alteraciones nucleares menos evidentes, que se conocen como células de Lutzner, y que por tanto puede resultar más difícil reconocer.
- **Linfomas de alto grado (LBDCG, LNH-T)** (Figura 3G). Los LNH de alto grado como por ejemplo el LBDCG no suele tener expresión periférica con frecuencia, salvo en casos de marcada infiltración de la médula ósea. En ese caso, las células neoplásicas suelen ser linfocitos de gran tamaño, con núcleo redondeado, cromatina laxa y varios nucléolos más o menos prominentes, citoplasma moderado y basófilo, en ocasiones vacuolado (implicando esta característica, a menudo, un dato más de agresividad del linfoma).

- **Leucemia/Linfoma T del adulto** (Figura 3H). Es una enfermedad heterogénea que se puede presentar en forma de leucemia o de linfoma con o sin expresión periférica y que está claramente asociada a la infección crónica por HTLV-1. Las células implicadas en esta neoplasia son linfocitos de mediano-gran tamaño con un núcleo pleomórfico y polilobulado aportándole el aspecto de célula “en pétalos de flor” tan característico. Pueden tener tanto cromatina condensada como más laxa con presencia de varios nucléolos y un citoplasma amplio, basófilo y sin granulación.

NEUTROPENIA

Ante los casos de neutropenia hay que descartar la presencia de blastos o de displasia, aunque hay que tener en cuenta también que las siguientes entidades pueden ser una causa importante de neutropenia:

- **Tricoleucemia** (Figura 4D). Habitualmente suele presentarse en forma de pancitopenia, incluyendo característicamente monocitopenia. Las células linfoides que caracterizan esta neoplasia, los tricoleucocitos, son de mediano tamaño, con una relación núcleo/citoplasma moderada o baja, un núcleo ovalado o alargado, a veces con una indentación en forma “de habichuela”, y con un citoplasma amplio, grisáceo y con numerosas vellosidades alrededor de la célula que le confieren el nombre de “célula peluda” o célula “en huevo frito”. El diagnóstico diferencial a nivel morfológico debe hacerse con la tricoleucemia variante, que suele presentarse con leucocitosis en vez de citopenias y tricoleucocitos con nucléolo central similar al de los prolinfocitos, y con el linfoma de la zona marginal esplénico con linfocitos vellosos circulantes, aunque este último suele tener vellosidades más polarizadas, un núcleo más poligonal y un citoplasma más basófilo.
- **Leucemia de linfocitos grandes granulares** (Figura 4C). Presenta linfocitos con morfología de linfocito grande granular pero de mayor tamaño, con una relación núcleo/citoplasma moderada, contorno nuclear redondeado y cromatina condensada, con citoplasma amplio, basófilo y con marcada granulación azurófila. Suelen presentar una linfocitosis con presencia de estos linfocitos grandes granulares > 10% de forma persistente (> 6 meses). Habitualmente se acompaña de neutropenia u otras citopenias autoinmune y suele asociarse a otros trastornos autoinmunes (típicamente la artritis reumatoide).
- **Síndrome mielodisplásico (SMD)**. Los síndromes mielodisplásicos pueden presentarse con anemia, trombocitopenia, neutropenia o cualquier combinación de ellas. Para el diagnóstico es necesaria la

combinación de citopenias con rasgos displásicos significativos en al menos una de las tres series hematopoyéticas. Aunque es necesario el estudio medular para su diagnóstico, la presencia de displasia en sangre periférica resulta muy orientativo. A continuación, se enumeran los principales signos de displasia en las tres series:

- **Diseritropoyesis** (displasia en serie eritroide) (Figuras 5A y 5B): El signo más habitual es la presencia de tamaños y formas muy variadas en los hematíes (anisopoiquilocitosis), aunque este rasgo es muy inespecífico. Ocasionalmente pueden observarse eritroblastos en sangre periférica cuya displasia es mucho más significativa, como puede darse en el caso de los defectos de hemoglobinización, multinuclearidad, asincronía madurativa, etc...
- **Dismegacariopoyesis** (displasia en serie megacariocítica) (Figuras 5C y 5D): dismorfia plaquetar, hipogranulación plaquetar, distribución anómala de la granulación (polarización o formación de pseudonúcleo).
- **Disgranulopoyesis** (displasia de serie granulocítica) (Figuras 5E y 5F): defectos de la granulación (hipogranulación, granulación aberrante (pseudo-Chediak), defectos en la segmentación nuclear (hiposegmentación pelgeroide, hipersegmentación, segmentación anómala), defectos en la condensación cromatínica (hipercondensación o *clumping*).

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Bain BJ. Blood Cells A Practical Guide. 4ª ed. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2006.
- Woessner Casas S, Florensa Brichs L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 5ªed. Madrid: Grupo Acción Médica, S.A. 2006.
- Merino A. Diagnóstico diferencial de las células linfoides atípicas en sangre periférica. Ed Cont Lab Clin; 16:20-40.
- Merino A. Manual de Citología de Sangre Periférica y Líquidos Biológicos. 2ª ed. Barcelona: Editorial Médica Panamericana. 2021.

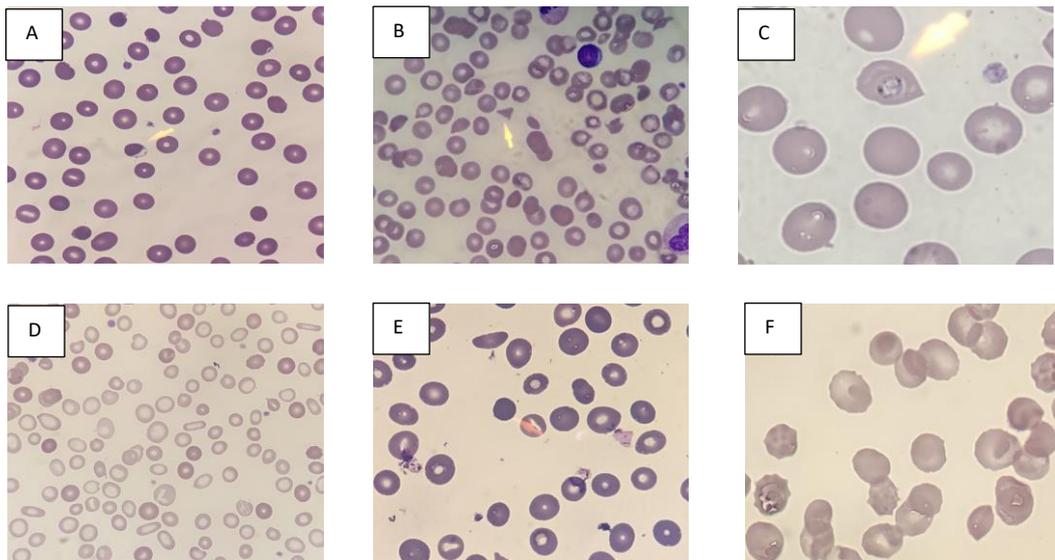


Figura 1. A. Excentricito o “célula mordida”. B. Esquistocitos. C. Plasmodium. D. Eliptocitos, microcitosis e hipocromía. E. Esferocito. F. Equinocito. Elaboración propia.

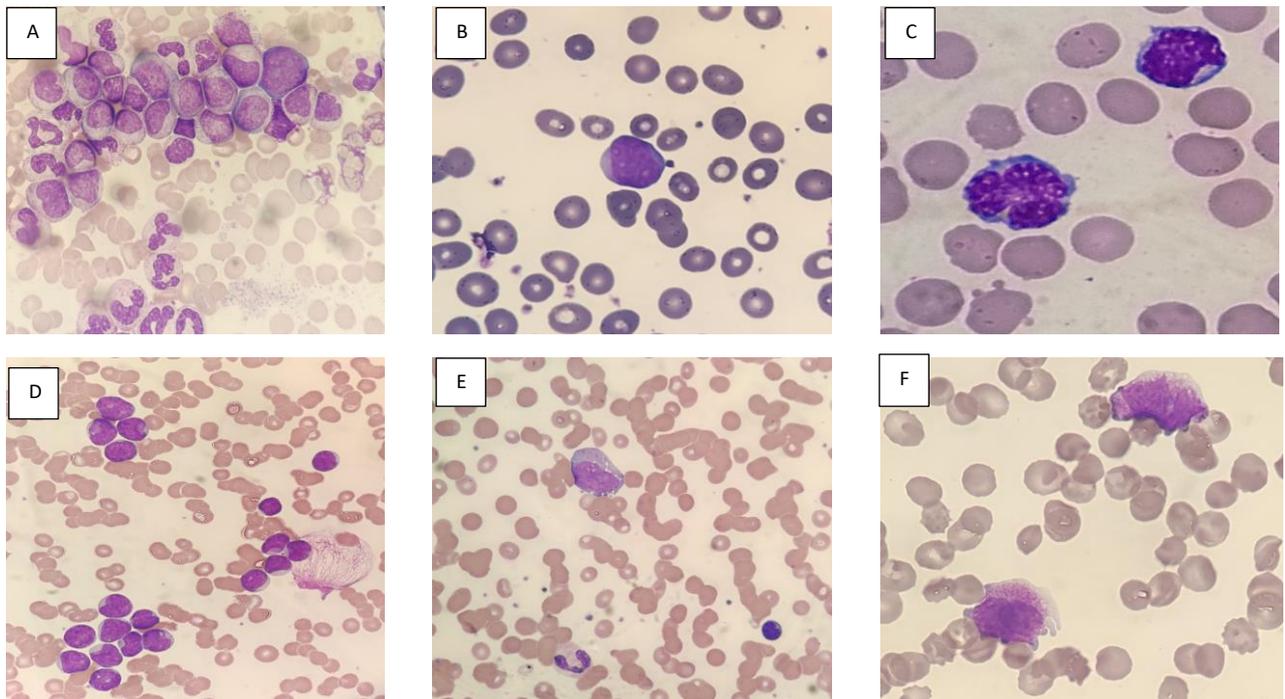


Figura 2. A. Leucemia mieloide crónica. B Leucemia linfoblástica aguda B. C. Leucemia linfoblástica aguda T. D. Leucemia mieloide aguda con “signo de la huella”. E. Leucemia mieloide aguda. F. Leucemia promielocítica aguda

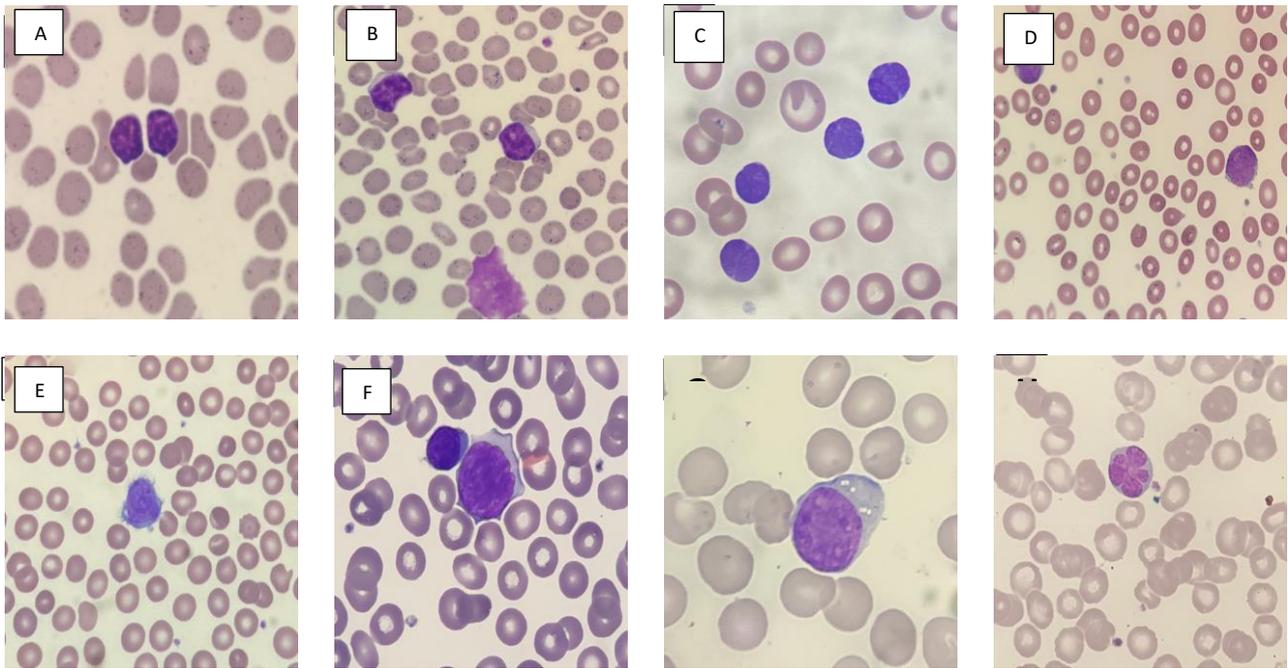


Figura 3. A. Leucemia linfocítica crónica. B. Leucemia prolinfocítica C. Linfoma folicular D. Linfoma de células del manto. E. Linfoma de la zona marginal. F. Micosis fungoide/síndrome de Sezary G. Linfoma de alto grado. H. Leucemia/linfoma T del adulto.

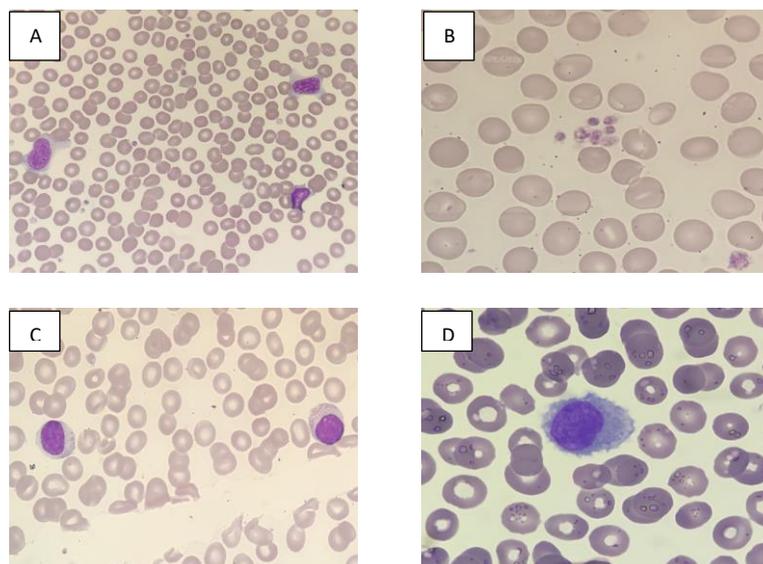


Figura 4. A. Linfocitos activados (Mononucleosis). B. Agregados de plaquetas. C. Linfocitos grandes granulares. D. Tricoleucocito o "Célula peluda"

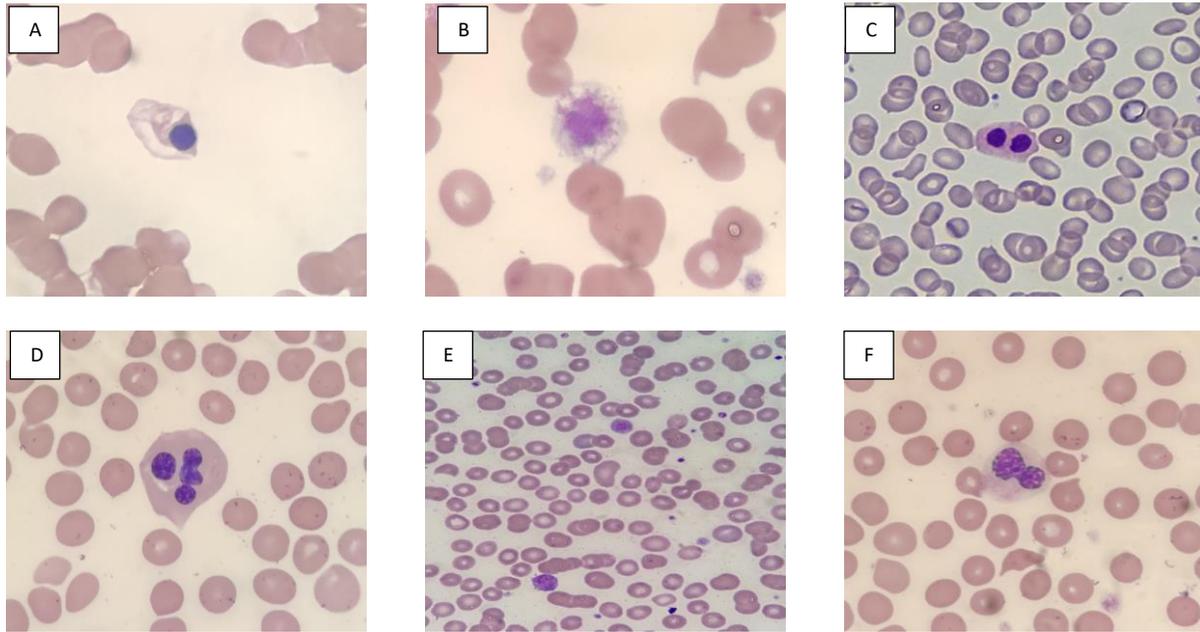


Figura 5. A. Eritroblasto con defectos de hemoglobinización. B. Eritroblasto multinucleado. C. Plaqueta con pseudonúcleo. D. Plaquetas gigantes. E. Neutrófilo hiposegmentado (pseudopelger). F Neutrófilo hipogranulado y con *clumping* cromático

CITOMORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA HEMATOLÓGICA DE LOS HEMATÍES. PATOLOGÍAS DE LA SERIE ROJA

Autor: Fernando Calvo Boyero¹, Pilar Duarte García¹, Sandra Gómez Rojas²

¹Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

²Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Hematología, Serie Roja, Biología Hematológica

SERIE ROJA

La patología eritrocitaria es consecuencia de la alteración de la eritrona, cuyo correcto funcionamiento depende del equilibrio entre la formación de eritrocitos en la médula ósea (eritropoyesis) y su eliminación por el sistema mononuclear fagocítico (eritrocitólisis).

Los factores capaces de modificar la eritropoyesis normal son muy diversos y pueden dar lugar a su defecto (anemia) o a su exceso (eritrocitosis o policitemia).

Aunque la división entre anemias y eritrocitosis está basada en la disminución o el aumento de la masa eritrocitaria, la anemia está funcionalmente mejor caracterizada por la concentración de hemoglobina, mientras que la eritrocitosis se define mejor por el hematocrito.

La anemia implica la disminución de la capacidad del transporte de oxígeno a los tejidos y los síntomas son consecuencia de la hipoxia tisular. En la práctica clínica se acepta que existe anemia cuando la concentración de hemoglobina es inferior a 13 g/dl (130 g/l) en el varón, inferior a 12 g/dl (120 g/l) en la mujer e inferior a 11 g/dl (110 g/l) durante la gestación.

• Clasificación etiopatogénica de las anemias

TABLA 3

Clasificación etiopatogénica de las anemias

Anemias regenerativas o "periféricas"
Hemorragia aguda
Anemias hemolíticas
Anemias arregenerativas o "centrales"
Insuficiencia medular por alteraciones de las células precursoras
Trastorno cuantitativo
Selectivo: eritroblastopenias (aplasia pura de células rojas)
Global: aplasias medulares (anemia aplásica)
Trastorno cualitativo (dismielopoyesis)
Congénito: diseritropoyesis congénitas
Adquirido: síndromes mielodisplásicos
Infiltración de médula ósea
Leucemias, linfomas, mieloma
Tumores sólidos
Mielofibrosis
Deficiencia de factores eritropoyéticos
Hierro
Anemia ferropénica
Anemia de los trastornos crónicos
Cobalamina y ácido fólico
Anemias megaloblásticas
Hormonas: eritropoyetina, hormonas tiroideas, andrógenos, corticoides

Figura 1. Clasificación etiopatogénica de las anemias. Tomado de: Montes Gaisán C, 2012.

Los mecanismos para la aparición de anemia son extraordinariamente simples: producción inadecuada de eritrocitos o pérdida prematura de los mismos por sangrado o hemólisis. Ello permite clasificar las anemias (clasificación etiopatogénica) en arregenerativas (la función de la médula es "insuficiente" como consecuencia de alteraciones de las células precursoras, infiltración medular o falta de nutrientes) y regenerativas (la médula responde al descenso de la masa eritrocitaria aumentando la producción de los eritrocitos).

El recuento de reticulocitos permite diferenciar las anemias en las que existe una respuesta medular adecuada de aquellas otras en las que existe una disminución en la producción de eritrocitos. El recuento de reticulocitos se expresa tanto en absoluto como en proporción de eritrocitos (bien en tanto por ciento [%] o en tanto por mil [‰]).

• Clasificación morfológica de las anemias

En la práctica clínica diaria, los parámetros analíticos, más que los clínicos, son más útiles a la hora de iniciar la aproximación diagnóstica de la anemia. El volumen corpuscular medio (VCM) es el parámetro que nos permite clasificar las anemias como microcíticas (VCM < 82 fl), normocíticas (VCM 82-98 fl) y macrocíticas (VCM > 98 fl).

- Anemias microcíticas

Ante una anemia microcítica, las tres posibilidades diagnósticas principales son la anemia ferropénica, la talasemia y la anemia de trastornos crónicos.

El primer paso diagnóstico será descartar la ferropenia, ya que ésta es la primera causa de anemia microcítica, y la prueba que nos permite confirmar el diagnóstico es la ferritina sérica. A pesar de ser un reactante de fase aguda, el diagnóstico de anemia ferropénica es improbable con niveles de ferritina normales o elevados (aunque en algunas entidades mixtas como la anemia de trastorno crónico con ferropenia podemos encontrarnos ferritinas en rango de normalidad o incluso elevadas). Los otros parámetros del metabolismo del hierro (hierro sérico, capacidad total de transporte de hierro, transferrina) no son capaces de diferenciar de forma segura la anemia ferropénica de la anemia de los trastornos crónicos.

El histograma de frecuencias o imagen de la distribución de los eritrocitos según tamaño y la ADE (amplitud de distribución del tamaño eritrocitario) o RDW (*red cell distribution width*), que representa una medida de la dispersión del histograma y, por tanto, de la anisocitosis. En la talasemia la ADE es normal, mientras que la ADE > 15 en

pacientes con anemia microcítica es sugestiva de ferropenia. La trombocitosis reactiva es también característica de la ferropenia.

Si los niveles de ferritina son normales, el siguiente paso en la evaluación de la anemia microcítica será el tiempo de evolución de esta. Una microcitosis evidente en analíticas previas implica un trastorno congénito, entre los cuales, la talasemia debe ser el principal diagnóstico de sospecha, lo que se debe confirmar mediante la electroforesis de hemoglobinas.

El diagnóstico diferencial de la anemia microcítica no ferropénica y no talasémica incluye la anemia de trastornos crónicos y la anemia sideroblástica, congénita o adquirida. La anemia de los trastornos crónicos es habitualmente normocítica.

- Anemias normocíticas

Las anemias carenciales, anemia de insuficiencia renal y anemia hemolítica deben ser inicialmente identificadas. Ante la sospecha de hemólisis se debe solicitar lactatodeshidrogenasa (LDH) (aumento de la destrucción celular), bilirrubina indirecta (aumento del catabolismo de la hemoglobina), haptoglobina (proteína que aclara la hemoglobina libre) y recuento reticulocitario (hiperplasia eritroide).

Cuando no es posible demostrar en el estudio de una anemia normocítica la deficiencia carencial, la insuficiencia renal o la hemólisis nos encontramos ante un trastorno primario de la médula ósea o anemia de trastornos crónicos.

- Anemias macrocíticas

En el caso de las anemias macrocíticas el primer paso es descartar la presencia de fármacos como hidroxiurea, metotrexato o trimetoprim, sin olvidar la ingesta habitual de alcohol.

La elevación del VCM puede orientarnos sobre la posibilidad de que se trate de una deficiencia de vitamina B12 y/o

folatos, sobre todo con valores de VCM superiores a 130 fl. La probabilidad de deficiencia carencial es inferior con VCM de 100 a 110 fl, por lo que el estudio de una anemia macrocítica se inicia con la petición de los niveles de vitamina B12 y ácido fólico (dependiendo de la situación también se puede solicitar homocisteína y ácido metilmalónico).

La extensión de sangre periférica puede orientar a la causa. Así, la presencia de hipersegmentación de los neutrófilos y macroovalocitos es característica de la deficiencia de vitamina B12 y folatos, la macrocitosis uniforme se asocia al consumo de alcohol, los dianocitos con hepatopatía y la policromasia con la hemólisis. La existencia de macrocitosis marcada no secundaria a fármacos ni carencial casi siempre se asocia con un problema primario de la médula ósea.

• Alteraciones morfológicas de los eritrocitos

- Alteraciones del propio hematíe

1. Esferocitos

Se denominan esferocitos a los hematíes de forma esférica que han perdido su palidez central. Son frecuentes en determinadas anemias hemolíticas congénitas (esferocitosis hereditaria) o adquiridas (anemia hemolítica autoinmune).

2. Eliptocitos

Los eliptocitos son hematíes alargados de extremos casi simétricos y contorno regular. Suelen verse en:

- Las eliptocitosis, enfermedades en las que existe un defecto congénito de la membrana eritrocitaria (espectrina)
- La SP de pacientes con anemia ferropénica

3. Ovalocitos

Los ovalocitos son hematíes de forma ovalada que frecuentemente se observan en la anemia megaloblástica.

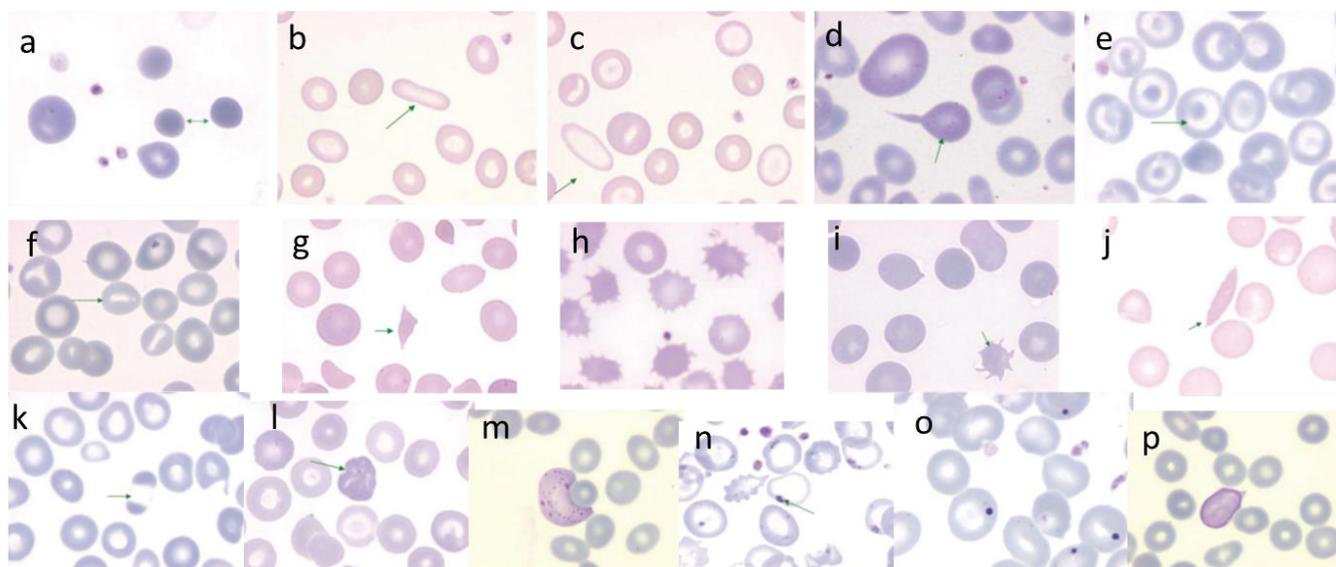


Figura 2. Diferentes morfologías del hematíe. a) Esferocitos, b) Eliptocitos, c) Ovalocitos, d) Dacriocitos, e) Dianocitos, f) Estomatocitos, g) Esquistocitos, h) Equinocitos, i) Acantocitos, j) Drepanocitos, k) Excentrocitos, l) Policromasia, m) Punteado basófilo, n) Cuerpos de pappenheimer, o) Cuerpos de howell-jolly, p) Anillo de Cabot. Tomado de: Merino A, 2015

4. Dacriocitos

Los dacriocitos son hematíes con forma de lágrima debido a que presentan una prolongación anómala. Su observación es frecuente en la mielofibrosis primaria, un tipo de neoplasia mieloproliferativa.

5. Dianocitos

Los dianocitos son hematíes con un exceso de superficie, que se pone de manifiesto por la presentación de un área central de mayor contenido hemoglobínico, lo que le confiere un aspecto parecido a una diana.

Los dianocitos se observan preferentemente en:

- las talasemias
- la anemia ferropénica
- las hepatopatías crónicas en las que se produce un aumento del colesterol y fosfolípidos de la membrana eritrocitaria.

6. Estomatocitos

Los estomatocitos son eritrocitos con exceso de agua, lo que se manifiesta por la presentación de una región en forma de boca en la zona central del hematíe. Pueden verse en las anemias hemolíticas, especialmente en las estomatocitosis congénitas. Con menor frecuencia pueden observarse también en el alcoholismo.

7. Esquistocitos

Se denominan esquistocitos a los hematíes fragmentados, que pueden presentar formas muy variadas. Son hematíes de tamaño muy pequeño (2-3) mm, que se forman habitualmente por fragmentación mecánica. Son frecuentes en la anemia hemolítica microangiopática. No es frecuente, pero a tener en cuenta la posible presencia de esquistocitos en la anemia megaloblástica por déficit de vitamina B12 o ácido fólico. En estos casos los esquistocitos se acompañan de macro ovalocitos, y el VCM se hallará aumentado (>110 fL).

8. Equinocitos

Los equinocitos son hematíes esferoidales que poseen espículas cortas distribuidas regularmente por toda su superficie (distribución simétrica). Son frecuentes en la sangre conservada debido a una disminución del ATP intraeritrocitario. También pueden observarse en la insuficiencia renal debido a la elevada concentración plasmática de determinados derivados metabólicos.

9. Acantocitos

Los acantocitos son hematíes de aspecto redondeado que muestran varias espículas aunque, a diferencia de los equinocitos, sus espículas son más alargadas y están distribuidas irregularmente en su superficie (distribución asimétrica). Se observan en:

- la a-betalipoproteinemia congénita (enfermedad congénita con ausencia característica de lipoproteínas plasmáticas)
- las hepatopatías severas
- la administración de heparina

- las anemias severas
- después de la esplenectomía

10. Drepanocitos

Se denominan drepanocitos o hematíes falciformes a los hematíes que presentan una forma semilunar, ya que son alargados y estrechos. Contienen una hemoglobina anormal, o hemoglobina S, en su forma desoxigenada. Al someter a la sangre a una situación de hipoxia, los polímeros de desoxihemoglobina S adoptan la forma de bastones alargados que se orientan siguiendo el eje longitudinal de la célula. Son típicos de la anemia falciforme.

11. Excentrocitos

En los excentrocitos la hemoglobina se halla distribuida de forma preferente en los extremos o polos del hematíe, por lo que puede apreciarse una zona central en el hematíe "vacía" de hemoglobina. Los excentrocitos pueden verse en las estomatocitosis congénitas y más frecuentemente en la denominada xerocitosis congénita (XC). La XC se debe a una alteración de la membrana del hematíe, que tiene como consecuencia un aumento de la permeabilidad pasiva de la misma al potasio con la consecuente salida de agua y, por tanto, deshidratación. Los excentrocitos también son frecuentes en el déficit de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa después de la ingesta de habas (favismo). En esta entidad los excentrocitos muestran predominantemente el desplazamiento de la hemoglobina hacia uno de los polos del hematíe.

12. Policromasia

Los hematíes jóvenes, que han abandonado recientemente la médula ósea, se tiñen de un color azul pálido debido a su elevado contenido en ribosomas. El hallazgo de un número elevado de hematíes que presentan coloración azulada se define con el término de policromasia. Estos hematíes más jóvenes suelen tener un tamaño ligeramente superior a los hematíes maduros y se denominan reticulocitos.

- Inclusiones eritrocitarias

1. Punteado basófilo

El significado de la presencia de punteado basófilo en el interior de los hematíes es equivalente al hallazgo de policromasia. Un alto número de estos hematíes puede indicar intoxicación por plomo.

2. Cuerpos de Pappenheimer

Otras inclusiones que pueden verse en los hematíes son los cuerpos de Pappenheimer. Sus características principales consisten en: a) son de pequeño tamaño y basófilos b) están situados en la periferia del hematíe c) contienen partículas de hierro d) se tiñen de color púrpura con la tinción de MGG.

Los hematíes que presentan este tipo de inclusiones se denominan siderocitos. Los siderocitos en anillo (eritroblastos con inclusiones de hierro que rodean

completamente al núcleo y que se ponen de manifiesto mediante tinción de Perls) son típicos de la anemia refractaria sideroblástica. La presencia de cuerpos de Pappenheimer es frecuente en la anemia sideroblástica congénita.

3. Cuerpos de howell-jolly

Los cuerpos de Howell-Jolly corresponden a inclusiones eritrocitarias redondeadas de alrededor de 1 mm de diámetro, que se tiñen de color violáceo (MGG), y que se observan frecuentemente después de la esplenectomía. Después de la esplenectomía, y debido a la falta de la función pitting del bazo, es frecuente la observación de cuerpos de inclusión eritrocitarios, tales como los cuerpos de Howell-Jolly o los cuerpos de Pappenheimer en la anemia sideroblástica congénita.

4. Anillos de cabot

Los anillos de Cabot son inclusiones de forma anular que se observan en determinadas circunstancias en el interior del hematíe. Corresponden a microtúbulos que proceden de una mitosis anormal, o bien a restos de la membrana nuclear del eritroblasto. Su hallazgo indica una alteración de la eritropoyesis, lo que se conoce con el término de diseritropoyesis.

● Metabolismo del hierro

El metabolismo del hierro corporal se lleva a cabo por un sistema muy eficiente que controla la absorción, la movilización desde sus depósitos y la recuperación del hierro previamente usado en función de las necesidades de la eritropoyesis en la médula ósea.

En la cara apical de los enterocitos duodenales se produce la reducción del hierro de la dieta por el citocromo-b, para posteriormente penetrar en la célula por el transportador de metales divalentes-1 (DMT-1). Una vez dentro de la célula, se deposita en forma de ferritina y es liberado al plasma mediante la ferroportina, transportada a su vez por la transferrina.

Además del aporte dietético, los macrófagos reutilizan el hierro procedente de los eritrocitos seniles. Por el contrario, no hay un mecanismo eficiente para eliminar el exceso de hierro, y éste sólo puede ser controlado disminuyendo la absorción. La alteración de la absorción puede dar lugar a exceso de hierro produciendo su depósito en los tejidos (como en la hemocromatosis [HC]) o por el contrario una deficiente absorción o distribución del hierro insuficiente para los requerimientos de la eritropoyesis determina la aparición de anemia, bien ferropénica o bien de causa inflamatoria.

En el estudio de la homeostasis del hierro se han implicado en los últimos años diversos genes y proteínas, entre los que la hepcidina parece ser el principal responsable del control de la absorción intestinal de hierro y su utilización por parte de los macrófagos.

- Hepcidina

Hormona implicada en la regulación del metabolismo del hierro, cuyo exceso se asocia a la anemia de trastornos crónicos y su defecto a trastornos por sobrecarga de hierro.

Su síntesis es inducida por el hierro ingerido. Se une a la ferroportina, proteína que exporta el hierro a la circulación desde los macrófagos, enterocitos y hepatocitos. La hepcidina suprime la absorción y liberación del hierro.

Además del hierro, se han descrito diferentes factores que controlan la producción de hepcidina. Entre ellos, las situaciones de infección e inflamación inducen la síntesis de hepcidina, mediada por citocinas como la interleucina 6 (IL-6) o la interleucina 1 (IL-1), reteniendo así el hierro en los depósitos, lo que podría ser un "mecanismo de defensa" ante estas agresiones

- Hemocromatosis

El término HC engloba a un conjunto de síndromes que se caracterizan por la sobrecarga crónica de hierro. Existen causas secundarias de HC, pero este término se emplea habitualmente para referirse a la HC de origen genético.

Las HC hereditarias afectan principalmente a individuos de raza caucásica, con más frecuencia en los países más septentrionales. Entre los caucásicos, aproximadamente 5 de cada mil son homocigotos para el alelo mutante C282Y del gen HFE en el cromosoma 6, y más del 10% son heterocigotos, aunque éstos desarrollan la enfermedad con menos frecuencia. La segunda mutación más frecuente es la H63D.

Así, las HC hereditarias se clasifican en base a la identificación de varias mutaciones genéticas:

1. **HC HFE.** Es la forma "clásica" o tipo 1. Representa más del 90% de los casos de HC. Su transmisión habitualmente es autosómica recesiva, y se debe a mutaciones en el gen HFE. La mayoría de los pacientes son homocigotos para la mutación C282Y o heterocigotos (C282Y/H63D); sin embargo, la prevalencia de la mutación H63D en la población general es mayor.
2. **HC juvenil o tipo 2.** Causada por una mutación en el gen HJV (tipo 2A) o en el gen de la hepcidina (HAMP) (tipo 2B). Suele presentarse antes de los 30 años y su curso es más rápido y grave que en el tipo 1.
3. **HC tipo 3.** Causada por mutaciones en el gen del receptor de la transferrina 2 (TFR2). Clínicamente es muy similar a la HC HFE.
4. **Enfermedad de la ferroportina o tipo 4.** Se debe a mutaciones en el gen de la ferroportina.
5. **Otras formas raras** de sobrecarga férrica de causa genética son debidas a mutaciones en el gen de la ceruloplasmina, el gen de la transferrina (atransferrinemia) o el gen del DMT-1.

En los últimos años se ha demostrado que la causa principal en la mayoría de formas de HC es la deficiencia de hepcidina. La expresividad clínica es heterogénea: astenia, somnolencia, dolor abdominal tipo cólico, artralgias. De forma tardía afectación hepática.

El diagnóstico de sospecha se establece si la ferritina sérica es superior a 400 ng/ml y el IST superior al 45% (mayor sensibilidad diagnóstica) en 2 determinaciones separadas un mínimo de 3 meses.

Para diagnóstico de confirmación: Demostración de la mutación C282Y en forma homocigota o heterocigota (C282Y/H63D). Confirmación del cúmulo de hierro mediante resonancia magnética (RM), tinción de Perls [Tiñe la hemosiderina en médula ósea. Se pueden observar como gránulos de color azul verdoso en el interior de los eritoblastos y los macrófagos] en la biopsia hepática (actualmente sólo de interés pronóstico) y flebotomía cuantitativa.

Flebotomías: Constituyen la principal medida terapéutica para reducir la sobrecarga férrica. Está indicada en todos los pacientes con ferritina superior a 300 ng/ml (200 ng/ml en mujeres). Se realizará en dos fases:

1. Fase de inducción: 1-2 flebotomías por semana, hasta ferritina < 50 ng/ml.
2. Fase de mantenimiento: flebotomías cada 1-4 meses, según las necesidades del paciente, para mantener el nivel de ferritina inferior o igual a 50 ng/ml.

ANEMIAS MICROCÍTICAS

• Anemia ferropénica

La anemia ferropénica se desarrolla de forma progresiva:

Fase 1. Ferropenia prelatente: Depleción de hierro en depósitos (ferritina baja) con sideremia normal

Fase 2. Ferropenia latente: Disminución de hierro sérico con índice de saturación de la transferrina bajo, sin anemia

Fase 3. Anemia ferropénica: hemoglobina baja

Las causas fisiológicas obedecen a un mayor consumo (crecimiento en la infancia y adolescencia, lactancia, embarazo) o al aumento de las pérdidas (menstruación), mientras que la hemorragia gastrointestinal es la causa patológica más frecuente de ferropenia, sobre todo en hombres y mujeres posmenopáusicas. Se deben principalmente a úlceras, ingesta crónica de fármacos (antiinflamatorios no esteroideos [AINE], anticoagulantes orales) y otros trastornos como hernia de hiato, varices esofágicas, diverticulosis o lesiones malignas. La infección por *Helicobacter pylori* también puede producir ferropenia. La malabsorción es más frecuente en personas jóvenes, generalmente por enfermedad celíaca, produciéndose una anemia de origen multifactorial por deficiencia asociada de ácido fólico y/o vitamina B12.

Diagnóstico

- VCM y HCM disminuidos
- ADE/RDW elevado
- Trombocitosis reactiva
- Frotis: Anisocitosis, microcitosis, hipocromía
- Hierro, IST bajos
- Transferrina elevada
- Ferritina baja (salvo que aumente como RFA)
- Receptor soluble de la transferrina (R-Tf) y la capacidad total de saturación de la transferrina (CTST) que se encontrarán elevados

• Talasemia

Es la causa de microcitosis no ferropénica más frecuente en nuestro medio. En la talasemia la microcitosis predomina sobre la hipocromía, y suele presentarse con hierro normal o sobrecarga de hierro en lugar de ferropenia.

La reticulocitosis, la policromatofilia y el punteado basófilo son más típicos que en la ferropenia. En los casos dudosos, se confirmará el diagnóstico mediante la electroforesis de hemoglobinas. Es importante recordar que ante la sospecha de talasemia, si coexiste un estado de ferropenia habrá que corregirlo antes, ya que la fracción HbA2 suele estar disminuida en estos casos.

TABLA 3
Diagnóstico diferencial de la anemia ferropénica

Valores normales	Anemia ferropénica	Anemia trastornos crónicos	Anemia sideroblástica	Talasemias
VCM (80-98 fl)	↓	N	No ↑	↓ ↓
HCM (26-33 pg)	↓ ↓	N	Doble población	↓
ADE o RDW (11,6-14,5%)	↑ ↑	↑	↑ ↑	N
Hierro sérico Hombres 80-180 µg/dl Mujeres 60-160 µg/dl	↓	↓	No ↑	No ↑
Transferrina (170-370 mg/dl)	↑	↓	No ↑	N
IST (≥ 16%)	< 10%	> 10%	↑	No ↑
CTST (250-460 µg/dl)	↑	↓ o N	↓ o N	No ↓
Ferritina (18-300 ng/ml)	↓	↑ o N	No ↑	No ↑

ADE: amplitud de distribución del tamaño eritrocitario; CTST: capacidad total de saturación de la transferrina; HCM: hemoglobina corpuscular media; IST: índice de saturación de la transferrina; VCM: volumen corpuscular medio.

Figura 3. Diagnóstico diferencial de la anemia ferropénica.

Tomado de: González de Villambrosia S, 2012.

En nuestro medio es muy importante hacer el diagnóstico diferencial entre anemia ferropénica y rasgo talasémico. En la anemia ferropénica existe una disminución proporcionada del VCM con el hematocrito y con la disminución de la concentración de hemoglobina. En la talasemia hay un aumento del número de hematíes y el VCM es desproporcionadamente bajo con respecto al grado de anemia.

Índice de Mentzer = VCM / hematíes (en millones)

Uso de índice de Mentzer, que será superior a 13 en la anemia ferropénica e inferior a 13 en el rasgo talasémico.

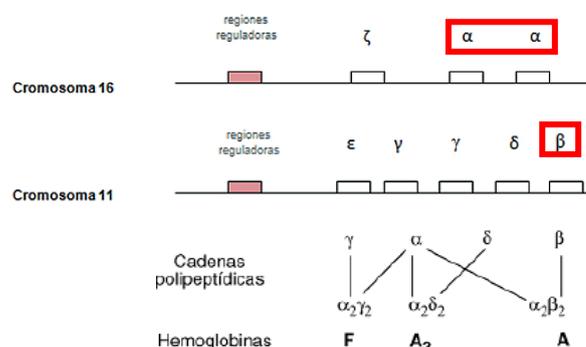


Figura 4. Genes de Hemoglobina. Adaptado de: Carrasco Salas P, 2013.

Se tratan de trastornos hereditarios de la biosíntesis de las globinas alfa o beta. Alfa y beta talasemia las más comunes. Autosómicas dominantes (hetero y homocigotos).

- Alfa-talasemia

Se caracteriza por la disminución de la síntesis de las cadenas alfa-globina debido a la mutación (generalmente deleción) de los genes que la codifican en el cromosoma 16. La expresividad clínica depende de los genes afectados y varía desde las formas asintomáticas (1 gen) hasta las incompatibles con la vida (4 genes).

Los defectos en 3 de los 4 genes (a-/-) perjudican gravemente la producción de la cadena alfa. El deterioro de la producción de cadenas alfa da como resultado la formación de tetrámeros con el exceso de cadenas beta, denominados hemoglobina H, o, durante la lactancia se forma hemoglobina de Bart a partir del exceso de cadenas gamma. Los pacientes con hemoglobinopatía H suelen tener anemia hemolítica sintomática y esplenomegalia.

Los defectos en los 4 genes mediante dos alelos alfa 0 (--/-) son un trastorno letal en la vida intrauterina (hidropesía fetal), porque la hemoglobina que carece de cadenas alfa no transporta oxígeno.

Tipos	Deleción	Características
α-Talasemia menor	-α/αα	Normalmente silente
α-Talasemia mayor	--/αα -α/-α	Hb, VCM y HCM son bajas Criterios de exclusión
Hb H	--/-α	Anemia crónica severa Hb H: tetrameros de β-globina
Hb de Bart	--/--	Hidropesía fetal / Anemia severa fetal HPLC de cordocentesis

Figura 5. Tipos de Alfa Talasemia. Elaboración propia.

- Beta-talasemia

Común en el Mediterráneo, África, Oriente Próximo, Asia e Indonesia (3-10%). Ventaja de heterocigotos frente a P. falciparum. >200 mutaciones descritas.

Tipos	Características	Laboratorio
β-Talasemia menor β/β+, β/β0	Asintomáticas Excepto en estrés hematopoyético	Hb normal (lig. baja) VCM: 48-72 fL
β-Tal intermedia β+/β+, β+/β0	Entre la mayor y la menor No transfusiones. Quelación Fe	Anemia moderada HB: 6-10 g/dL
β-Talasemia mayor (Anemia de Cooley) β0/β0	En niños: retraso crecimiento, infec. recurrentes, esplenomegalia y cambios en huesos faciales Transfusiones sanguíneas	Anemia severa HB: 3-6 g/dL VCM: 48-72 fL CHCM: 23-32 g/dL
δβ-Talasemia (Hb Lepore)	Deleción y unión entre los genes de la globina δ y β. Mediterráneo (Grecia e Italia)	Hb: 8-13 g/dL VCM: normal

Figura 6. Tipos de Beta Talasemia. Elaboración propia.

Se produce por la disminución (beta +) o ausencia (beta 0) de la síntesis de la beta globina, codificada por dos genes situados en el cromosoma 11. La cantidad de expresión de los genes (beta + o beta 0) da lugar a una gran variabilidad clínica, a lo cual contribuye la posible coexistencia de mutaciones del gen de la beta globina y la cantidad de HbF.

La beta-talasemia menor (rasgo) ocurre en pacientes que son heterocigotos (b/b+ o b/b0), habitualmente asintomáticos con anemia microcítica leve a moderada. Este fenotipo también puede ocurrir en casos leves de b+/b+.

La beta-talasemia intermedia es un cuadro clínico variable que es intermedio entre la talasemia mayor y la menor y se debe a la herencia de dos alelos de beta talasemia (b+/b0 o casos graves de b+/b+).

La beta-talasemia mayor (o anemia de Cooley) ocurre en pacientes homocigotas (b0/b0) o heterocigotas compuestas graves (b0/b+) y es el resultado de la deficiencia grave de la beta globina. Estos pacientes desarrollan anemia grave e hiperactividad de la médula ósea.

- Delta Beta-talasemia

Especialmente frecuente en el área mediterránea, se caracteriza por la disminución o ausencia de la síntesis de las cadenas beta y delta, con gran heterogeneidad molecular que condiciona la importante variabilidad clínica. La forma heterocigota es asintomática, destacando únicamente microcitosis leve y aumento de HbF (7-15%) de distribución heterogénea sin aumento de HbA2.

- Electroforesis de hemoglobinas

Una vez descartada la ferropenia, es preciso investigar como posible causa de anemia microcítica la presencia de una hemoglobinopatía. Habitualmente estas entidades se diagnostican en la infancia, mientras que los adultos con talasemia son, en general, heterocigotos para la forma alfa o beta e incluso pueden no presentar anemia. El diagnóstico se realizará con la determinación de la HbA2, HbF y electroforesis de hemoglobina. Para las variantes alfa se realizan estudios moleculares específicos.

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
P1	---	0.1	0.74	953
F	13.6*	---	1.11	235045
A0	---	2.5	2.28	44152
A2	3.0	---	3.65	58943
S-window	---	80.7	4.41	1419104

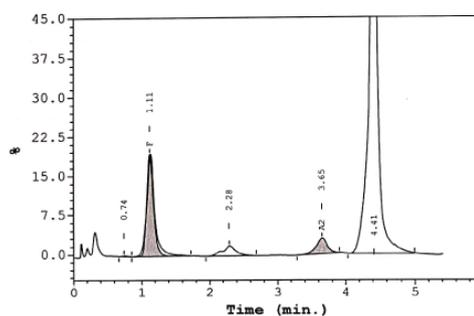


Figura 7. Electroforesis de Hemoglobina. Elaboración propia.

• Anemia de trastornos crónicos o anemia inflamatoria

La anemia suele ser normocítica y normocrómica, con sideremia baja, ferritina normal o aumentada y un IST normal o ligeramente disminuido. El estudio de la médula ósea es útil, ya que el hierro teñido estará normal o aumentado en este caso, al contrario que en la anemia ferropénica.

● **Anemia sideroblástica adquirida**

Los hallazgos sanguíneos suelen simular a los que aparecen en la ferropenia, y los reticulocitos también están bajos, pero el hierro sérico suele estar normal o aumentado. La confirmación del diagnóstico exige la realización del aspirado de médula ósea, donde los depósitos de hierro y los sideroblastos estarán aumentados.

ANEMIAS MACROCÍTICAS

Se definen como anemias macrocíticas el conjunto de entidades que cursan con aumento del volumen corpuscular medio (VCM) por encima de 98 fl.

Para el estudio inicial es necesaria la realización de dos determinaciones básicas: reticulocitos (anemia regenerativa/no) y extensión de sangre periférica (búsqueda de megaloblastosis: macrocitosis, anisocitosis, hipersegmentación de los neutrófilos (pleocariocitos) e incluso poiquilocitosis en los casos graves).

Posteriormente se analizarán de forma conjunta los niveles séricos de cobalamina y/o folatos, cuya deficiencia supone la causa más frecuente de macrocitosis con eritropoyesis megaloblástica. Las causas más frecuentes de disminución de los niveles de vitamina B12 o folatos incluyen deficiencia nutricional, alteraciones en la absorción a nivel gástrico (gastritis atrófica, anemia perniciosa por ausencia de factor intrínseco) o a nivel intestinal (compromiso ileal, compromiso yeyunal, sobrecrecimiento bacteriano), fármacos, aumento de los requerimientos (embarazo, enfermedades malignas), exceso de pérdidas o causas hereditarias. La anamnesis y el examen físico detallados, los anticuerpos antifactor intrínseco, anticuerpos antiparietales y, en función de los hallazgos, la gastroscopia con toma de biopsia, nos aproximarán al diagnóstico. Cuando la anemia se debe a un fallo de la mucosa gástrica para la secreción de factor intrínseco necesario para la absorción de vitamina B12, se llama Anemia perniciosa, y se produce eritropoyesis ineficaz.

Si no se confirma la anemia carencial, es preciso realizar pruebas de función tiroidea, así como buscar alteraciones hepáticas, principalmente la hepatopatía alcohólica y la cirrosis, que justifiquen la anemia.

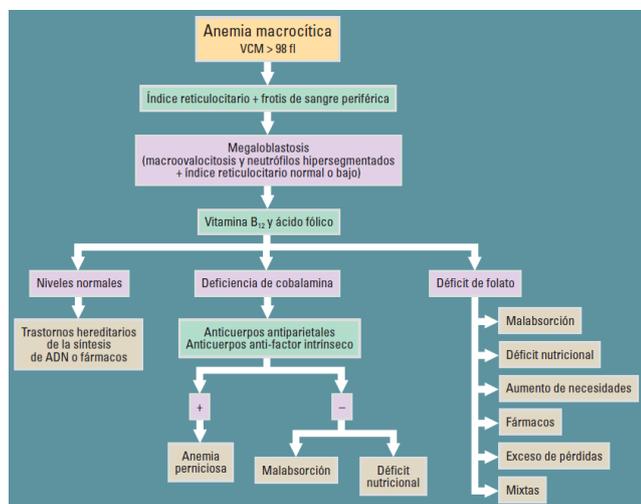


Figura 8. Diagnóstico diferencial de anemia macrocítica. Adaptado de: Bastos Oreiro M, 2008.

Si con todos los datos previos no se llegara al diagnóstico, será necesaria la realización del aspirado y la biopsia de médula ósea para descartar un síndrome mielodisplásico, aplasia medular o infiltración metastásica de una neoplasia sistémica no hematológica.

ANEMIAS NORMOCÍTICAS

En el estudio inicial de cualquier tipo de anemia, es fundamental realizar una anamnesis y una exploración física detalladas como primer paso para la aproximación diagnóstica. En el caso de las anemias normocíticas esto es especialmente importante, por ser la que más se relaciona con otros trastornos sistémicos (hepatopatía, endocrinopatía, etc.), sangrado y hemólisis.

Para iniciar el estudio y establecer la etiología de la anemia es necesario realizar algunos estudios de laboratorio básicos como hemograma, recuento reticulocitario, estudio morfológico de sangre periférica y determinación de velocidad de sedimentación globular (VSG), que en el caso de las anemias normocíticas se completa con el estudio del metabolismo férrico, vitamina B12 y ácido fólico, creatinina sérica, pruebas de función hepática, tiroidea y niveles de cortisol, así como niveles de eritropoyetina (EPO) sérica para descartar insuficiencia renal crónica, endocrinopatía o hepatopatía asociadas. En algunas ocasiones será necesario realizar aspirado y biopsia de médula ósea para completar el estudio.

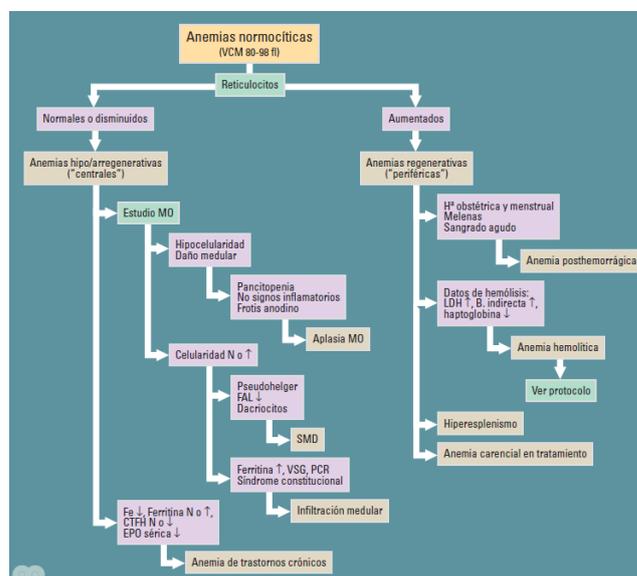


Figura 9. Diagnóstico diferencial de anemia normocítica. Adaptado de: Batlle A, 2012.

ANEMIAS HEMOLÍTICAS

Al final de su ciclo vital normal (alrededor de 120 días), los eritrocitos son eliminados de la circulación. La hemólisis se define como la destrucción prematura y, por lo tanto, acorta la vida media de los eritrocitos (< 120 días). Se produce anemia cuando la producción en la médula ósea ya no puede compensar la reducción en la supervivencia de los eritrocitos.

Se sospecha una hemólisis en pacientes con anemia y reticulocitosis. Si se presume una hemólisis, se examina el frotis periférico y se determinan bilirrubina sérica, LDH, haptoglobina (disminuye en hemólisis) y AST. El frotis periférico y el recuento de reticulocitos son las pruebas más importantes para diagnosticar la hemólisis. La prueba de antiglobulina (coombs directo) o la detección de hemoglobinopatías (p. ej., por HPLC) pueden ayudar a identificar la causa de la hemólisis.

Mecanismo	Trastorno o agente
Alteraciones intrínsecas de los eritrocitos	
Trastornos adquiridos de la membrana eritrocítica (NO HEREDITARIOS)	Hipofosfatemia Hemoglobinuria paroxística nocturna Estomatocitosis
Trastornos congénitos de la membrana eritrocítica (Membranopatías)	Eliptocitosis hereditaria Esferocitosis hereditaria Estomatocitosis hereditaria
Trastornos de la síntesis de hemoglobina (Hemoglobinopatías)	Enfermedad de hemoglobina C Enfermedad de hemoglobina E Enfermedad de hemoglobina S-C Anemia drepanocítica Talasemias
Trastornos del metabolismo del eritrocito (Enzimopatías)	Defectos de la vía glucolítica (Déficit de piruvato kinasa) Defectos de la vía de derivación de hexosas monofosfato (Déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa [G6PD])
Trastornos extrínsecos al eritrocito	
Trastornos inmunitarios	Anemias hemolíticas autoinmunes: <ul style="list-style-type: none"> • Crioanticuerpos • Inducida por fármacos • Virus Epstein-Barr • Síndrome urémico hemolítico • Micoplasmas • Criohemoglobinuria paroxística • Púrpura trombocitopénica idiopática • Anticuerpos calientes
Microorganismos infecciosos	<i>Babesia</i> <i>Bartonella bacilliformis</i> <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. vivax</i>
Traumatismo mecánico	Hemoglobinuria de la marcha Valvulopatías cardíacas
Hiperactividad reticuloendotelial	Hiperesplenismo
Producción de toxinas por microorganismos infecciosos	<i>Clostridium perfringens</i> Estreptococos alfa-hemolíticos y beta-hemolíticos Meningococos
Toxinas	Compuestos con potencial oxidante (p. ej., dapsona, fenazopiridina, naftaleno) Cobre (enfermedad de Wilson) Plomo Veneno de insectos, serpientes

En Rojo: Hereditarios.

Tabla 1. Mecanismos de anemia hemolítica. Elaboración propia.

La hemólisis se puede clasificar según si la hemólisis es

- Intrínseca: debido a un defecto dentro del eritrocito; las anomalías eritrocíticas intrínsecas usualmente son hereditarias (excepto trastornos adquiridos de membrana eritrocítica).
- Extrínseca: desde una fuente externa al eritrocito; los trastornos extrínsecos al eritrocito generalmente son adquiridos.

- **Anemias hemolíticas congénitas**

- **Membranopatías**

Las membranopatías son el conjunto de entidades clínicas caracterizado por la alteración de la forma y/o deformabilidad del eritrocito debido al defecto proteico de su membrana.

- **Enzimopatías**

Las enzimopatías son el conjunto de enfermedades que aparecen como consecuencia de la alteración de cualquiera de las enzimas que intervienen en el metabolismo energético del eritrocito. Éste se compone de tres grandes vías: la glucólisis anaerobia, el metabolismo óxido-reductor y el metabolismo nucleotídico. Las mutaciones genéticas causantes de enzimopatías pueden cursar como un síndrome hemolítico con anemia, cianosis con metahemoglobinemia o eritrocitosis.

1. Déficit de G6PDH

La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas-fosfato, de forma que se obtiene NADPH que protege al eritrocito del estrés oxidativo, manteniendo al glutatión en estado reducido. Su deficiencia constituye la enzimopatía congénita más frecuente, afectando a más de 400 millones de personas en el mundo.

Su distribución geográfica es similar a la de la malaria, debido a la protección que ofrece frente a la infección por *Plasmodium falciparum*.

Generalmente, estos pacientes permanecen asintomáticos durante años, hasta la exposición a algún factor desencadenante, fundamentalmente fármacos oxidantes e infecciones, con aparición de hemólisis aguda intravascular con hemoglobinuria. La hemólisis inducida por habas constituye un síndrome especial, conocido como favismo, que fue descrito por primera vez por Pitágoras en el siglo V. También se relaciona con la ingesta de otros alimentos que contengan divicina, isouramilo o convecina, como los berros.

La Organización Mundial de la salud (OMS) describe tres variantes de la deficiencia de G6PDH: tipo 1, síndrome hemolítico crónico de intensidad variable con 0% de actividad enzimática; tipo 2, asintomático hasta exposición a agente oxidante, con una actividad enzimática del 5-15%, y tipo 3, asintomático con actividad enzimática normal.

En el frotis se observan excentrocitos, que son hematíes donde la hemoglobina se ha polarizado hacia uno de los lados o ambos lados del hematíe. El grado de actividad enzimática puede determinarse, de forma indirecta,

mediante la medición por espectrofotometría de la síntesis de NADPH o de la cantidad de glutatión reducido. El diagnóstico definitivo requiere el estudio mutacional con análisis molecular.

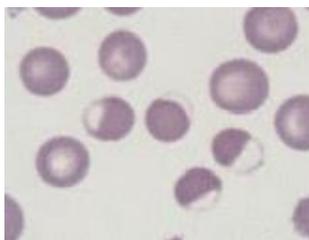


Figura 10. Excentrocitos. Adaptado de: <https://quizlet.com>.

2. Déficit de PK

Las alteraciones enzimáticas a este nivel impiden la obtención de energía en forma de adenosintrifosfato (ATP) por parte del eritrocito.

La heterocigosis carece de expresión clínica, salvo ictericia neonatal y episodios de hemólisis leve en relación con infecciones o tratamiento con anticonceptivos orales. Los individuos homocigotos presentan hemólisis crónica de intensidad variable que se manifiesta por primera vez en el período neonatal o durante los primeros años de vida.

En el examen morfológico podemos observar equinocitos, reticulocitosis, macrocitosis y trombocitosis. El diagnóstico se basa en la medición de la actividad enzimática eritrocitaria.

- Hemoglobinopatías

Está formada por cuatro subunidades proteicas (globinas) iguales dos a dos, con un grupo hemo en cada una de ellas. Existen seis tipos de cadenas globínicas: alfa, beta, gamma, delta, épsilon y zeta. La Hb humana adulta es una mezcla de tres subtipos: HbA1 ($\alpha_2\beta_2$), que representa más del 90% del

total, HbA2 ($\alpha_2\delta_2$), y HbF ($\alpha_2\gamma_2$), que representa menos del 1% del total.

Las hemoglobinopatías se producen por la síntesis defectuosa de la Hb, ya sea en su estructura (alteración cualitativa) dando lugar a las hemoglobinopatías estructurales, o en su cantidad (talasemias) o ambas (hemoglobinopatías talasémicas).

1. Hemoglobinopatías estructurales

Existen más de 1.000 tipos de hemoglobinopatías estructurales descritas que afectan aproximadamente al 7% de la población mundial. Su distribución geográfica es similar a la de la malaria, debido a que proporcionan resistencia frente a la infección por *Plasmodium falciparum*. La HbS y la HbC tienen especial predilección por la raza negra, la HbE es típica del sudeste asiático, la HbD Punjab de India y la HbO-Arab de Extremo Oriente.

La electroforesis convencional a pH alcalino constituye la mejor prueba diagnóstica, pero a veces es preciso realizar electroforesis a pH ácido, isoelectroenfoque o técnicas de HPLC o secuenciación para una correcta identificación de las variantes.

- Hemoglobinopatía S

La HbS o anemia de células falciformes (anemia drepanocítica) es la hemoglobinopatía más frecuente (45% en determinadas zonas del África tropical) y también la de mayor impacto sanitario a nivel mundial, con un aumento creciente de su importancia debido a la inmigración.

Se produce por una mutación estructural, la sustitución de la base timina por adenina en el codón 6 del gen β de la globina, con sustitución de ácido glutámico por valina en la secuencia de aminoácidos. Cuando la Hb se desoxigena, el eritrocito adquiere forma de hoz (drepanocito).

La estructura del hematíe favorece su adherencia al endotelio vascular, provocando por un lado la

	Esferocitosis (++)	Eliptocitosis (+)	Estomatocitosis	Acantocitosis
Alteración	Anquirina (+), banda 3, espectrina	Espectrina, proteína 4.1, espectrina, glucoforina	Permeabilidad a cationes	Colesterol y fosfolípidos
Síndromes y clínica	Variable. Hemólisis neonatal y transfusiones continuas hasta asintomático	Variable. Suele ser leve. * En zonas de paludismo muy prevalente (30%) porque ofrece resistencia a <i>P.falciparum</i>	Xerocitosis: Hematíe deshidratado Pseudohiperpotasemia	Abetalipoproteinemia: Neuropatía, retinitis pigmentosa
Situaciones adquiridas	Anemia hemolítica	Eliptocitos muy comunes (talasemia, ferropenia, etc.)	Alcoholismo, Insuficiencia hepática	Desnutrición grave, alcoholismo
Morfología del hematíe				

Tabla 2. Hemoglobinopatías estructurales. Elaboración propia.

obstrucción al flujo sanguíneo por agregación plaquetaria, lo que representa uno de los factores desencadenantes de las crisis vasooclusivas propias de la enfermedad.

Es posible distinguir las siguientes variantes:

1. Rasgo falciforme en individuos heterocigotos (HbAS) del gen β : los datos de laboratorio y la morfología eritrocitaria son normales; permanecen asintomáticos hasta que se exponen a factores favorecedores, presentando clínica de crisis vasooclusiva más que de anemia hemolítica.

2. Anemia falciforme o drepanocitosis en portadores homocigotos de HbS (HbSS): los síntomas clínicos dependen de la edad del paciente, pues en el período neonatal la HbS no produce sintomatología. Debido a la compensación que ejerce la HbF; en los primeros años de vida (1-4 años), la hemólisis es moderada o intensa, junto con hiperesplenismo por secuestro eritrocitario, que puede complicarse con autoesplenectomía por infartos esplénicos de repetición, y a partir de los cuatro años (fase de expresividad aguda) el cuadro anémico se agrava y las crisis vasooclusivas se hacen frecuentes, en relación con factores desencadenantes.

Tratamiento: La hidroxiurea produce un aumento de la HbF, impidiendo la formación de polímeros de HbS, y previene la aparición de crisis vasooclusivas.

- Hemoglobinopatía C

Se produce por la sustitución del ácido glutámico de la posición 6 por lisina en la cadena β . Es prácticamente exclusiva de la raza negra, correspondiendo los pocos casos descritos en España a las regiones de Andalucía y Extremadura. Al igual que la HbS, se acompaña de la alteración de la carga eléctrica superficial del eritrocito y de la disminución de su solubilidad, por lo que la Hb tiende a cristalizarse, sobre todo ante determinadas situaciones predisponentes, como la hipoxia. Su expresividad clínica es variable y depende de la alteración genética subyacente.

1. HbC heterocigota (HbAC), que no presenta síntomas.

2. HbC homocigota (HbCC), la clínica varía desde los individuos asintomáticos a los que presentan anemia moderada normocítica e hiperocrómica, con reticulocitosis leve. En el frotis se observan cristales intraeritrocitarios de HbC, en forma de línea gruesa, así como diancitos.

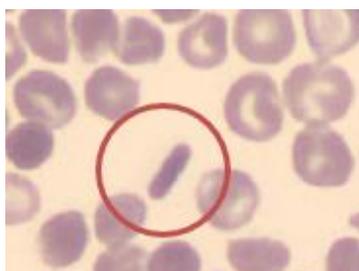


Figura 11. Cristal de Hemoglobina C. Elaboración propia.

- Hemoglobinopatías inestables

Conjunto de patologías caracterizado por la alteración de un aminoácido de las cadenas globínicas que condiciona la disminución de la solubilidad de la Hb, dando lugar a su precipitación y desnaturalización, con la aparición de cuerpos de inclusión intraeritrocitarios o cuerpos de Heinz. La más frecuente es la Hb Köln. Existe la Hb Madrid.

- Hemoglobinopatías con alteración de la afinidad por el oxígeno

Se producen como consecuencia de la sustitución de un aminoácido en el punto de contacto entre las cadenas alfa y beta, donde se regula la fijación reversible del oxígeno molecular y se mantiene el equilibrio oxi-Hb/desoxi-Hb.

- Hemoglobinopatía M

Se caracteriza por la presencia de hierro en estado férrico en dos de los cuatro grupos hemo, por mutación tanto de las cadenas alfa como de las beta, dando lugar a un estado de oxigenación parcial continuo de la Hb.

• **Anemias hemolíticas adquiridas de origen inmune**

Se debe a la destrucción de los eritrocitos por acción de componentes plasmáticos relacionados con el sistema inmune: inmunoglobulinas, complemento o fármacos inmunógenos.

Pueden clasificarse en cinco grupos:

1. Anemia hemolítica autoinmune (AHAI).
2. Reacción hemolítica postransfusional.
3. Enfermedad hemolítica del recién nacido.
4. Anemia hemolítica inmunomedicamentosa.
5. HPN.

- **Anemia hemolítica autoinmune (AHAI)**

En la AHAI la hemólisis se produce por la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra los antígenos de la membrana eritrocitaria de los propios hematíes.

TABLA 1
Tipos de anemia hemolítica autoinmune

	AHAI por AC	AHAI por AF	HPF
Isotipo de anticuerpo	IgG, raramente IgA, IgM	IgM	IgG
Test de antiglobulina directa	IgG, raramente C3	C3	C3
Especificidad antigénica	Múltiple, principalmente Rh	i/I	P
Tipo de hemólisis	Extravascular	Extravascular	Intravascular
Enfermedades asociadas	Procesos linfoproliferativos y autoinmunes	Virus Neoplasias	Virus Sífilis

AC: anticuerpos calientes; AF: anticuerpos fríos; AHAI: anemia hemolítica autoinmune; HPF: hemoglobinuria paroxística a frigore; Ig: inmunoglobulina.
Modificada de Melody J, et al².

Figura 12. Tipos de anemia hemolítica autoinmune.
Tomado de: Montes Gaisán C, 2012.

- **Reacción hemolítica postransfusional.**

Las reacciones hemolíticas postransfusionales están producidas por anticuerpos del receptor dirigidos contra antígenos de la membrana eritrocitaria de un donante no compatible.

Inmediata: Es la complicación más grave. Se produce por anticuerpos preformados, y por tanto prácticamente exclusiva de la incompatibilidad ABO. Cursa con hemólisis intravascular masiva, shock, insuficiencia renal y coagulación intravenosa diseminada (CID).

Retardada: Se produce en individuos inmunizados por una transfusión o embarazo previos al recibir una nueva transfusión. El título de anticuerpos es muy bajo y no se detecta en las pruebas pretransfusionales. En la mayoría de los casos la hemólisis es lenta y pasa inadvertida.

- **Enfermedad hemolítica del recién nacido.**

Está producida por anticuerpos maternos de naturaleza IgG dirigidos contra antígenos presentes en la membrana eritrocitaria fetal de origen paterno.

Para que la madre desarrolle dichos anticuerpos debe haber sido previamente inmunizada (excepto en la incompatibilidad ABO) por transfusiones previas o durante embarazos anteriores. Los anticuerpos anti-D han sido los implicados más frecuentemente en la EHRN, pero no son los únicos: anti-C, anti-E y anti-K también pueden provocar EHRN.

- **Anemia hemolítica inmunomedicamentosa.**

Es una causa poco frecuente de anemia hemolítica, y se ha asociado a fármacos empleados comúnmente como la penicilina o la alfa-metil dopa.

- **Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN)**

La HPN es un trastorno clonal no maligno, adquirido de la célula madre pluripotente de la hematopoyesis. Origina una clona de células que adquieren una mutación somática en el gen PIG-A que condiciona la carencia total o parcial de la expresión de proteínas ancladas a la membrana del hematíe. Es una enfermedad poco frecuente, con una prevalencia de 7,8-15,9 casos por millón de habitantes al año.

La clínica de HPN se basa en anemia hemolítica intravascular asociada a trombosis. Se produce un síndrome hemolítico crónico que puede permanecer estable largos períodos de tiempo o bien presentar crisis de agudización paroxística. Las crisis pueden aparecer durante la noche o tras situaciones desencadenantes como ingesta alcohólica, esfuerzos físicos, infecciones, intervenciones quirúrgicas, vacunaciones, menstruación o ingesta de fármacos.

La hemoglobinuria es un fenómeno constante en la HPN; evidente durante las crisis pero también presente en las formas crónicas, puede demostrarse a través de la presencia de hemosiderinuria en las células de descamación epitelial del sedimento urinario.

Tradicionalmente, el diagnóstico se realizaba mediante una prueba de hemólisis en medio ácido o prueba de Ham y la prueba de la sacarosa. Actualmente estas técnicas están en desuso por su complejidad y escasa sensibilidad. El diagnóstico de certeza se realiza mediante citometría de flujo.

Recientemente se ha aprobado el tratamiento de la HPN con eculizumab, anticuerpo IgG humanizado contra la fracción C5 del complemento.

• **Anemias hemolíticas adquiridas de origen no inmune**

Se distingue de la anemia hemolítica de origen inmune principalmente por la negatividad del coombs directo. Puede clasificarse en:

1. Hemólisis mecánica: PTT, SHU
2. Hemólisis tóxica:
 - a. Fármacos (Sulfonamidas, Salicilatos, Nitrofurantoína)
 - b. No fármacos: Nitratos, Paraquat, O₂ a altas dosis, H₂O parenteral
 - c. Otros: Plomo, Arsénico, Veneno de serpientes
3. Hemólisis por agentes infecciosos: *E. coli O157*, *Bartonella*, *Plasmodium*, *Babesia*, *Leishmania*
4. Hiperesplenismo.

- **Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT)**

Es una microangiopatía trombótica generalizada que afecta al endotelio de arteriolas y capilares de numerosos órganos vitales, produciendo una suboclusión de las mismas con una baja incidencia de presentación que suele afectar a adultos jóvenes y predomina en el sexo femenino.

Existen dos formas de presentación: familiar e idiopática. La forma familiar o congénita es debida a mutaciones en ADAMTS 13. En las formas adquiridas idiopáticas la deficiencia de ADAMTS 13 es muy variable, y se ha asociado a la presencia de anticuerpos inhibidores tipo IgG o IgM.

Se observan datos comunes de anemia hemolítica intravascular, trombopenia marcada y en el examen del frotis de sangre periférica es característico encontrar abundantes esquistocitos. La PAD es negativa. Los estudios de coagulación de rutina suelen ser normales, excepto aumento de dímero D y productos de degradación del fibrinógeno (PDF).

- **Síndrome Hemolítico Urémico (SHU)**

Es una enfermedad grave, propia de la edad infantil. Se trata de la causa más frecuente en pediatría de insuficiencia renal aguda en el medio extrahospitalario. Se caracteriza por la tríada de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda. En más del 75% de los casos aparece después de una infección, casi siempre por *Escherichia coli*, serotipo O157:H7. En el frotis de sangre periférica encontraremos un número variable de esquistocitos.

ERITROCITOSIS

Se define la policitemia o eritrocitosis como el aumento de la masa eritrocitaria. Se debe iniciar el diagnóstico diferencial ante cualquier paciente que presente hemoglobina o hematocrito elevado.

Si la masa eritrocitaria está elevada debemos proseguir el estudio cuantificando inicialmente los niveles de eritropoyetina (EPO):

- Disminuidos: Si se encuentran disminuidos probablemente nos encontremos ante una policitemia vera. Para confirmarlo debemos realizar una biopsia de médula ósea, donde encontraremos hiperplasia global,

y se determinará la mutación V617/JAK2, que se presenta hasta en el 95% de las policitemias vera (aunque no es específica)

- Elevados: Si están elevados debemos plantearnos si este aumento en la concentración de EPO se debe a una producción excesiva secundaria a hipoxia, o a una secreción inadecuada.

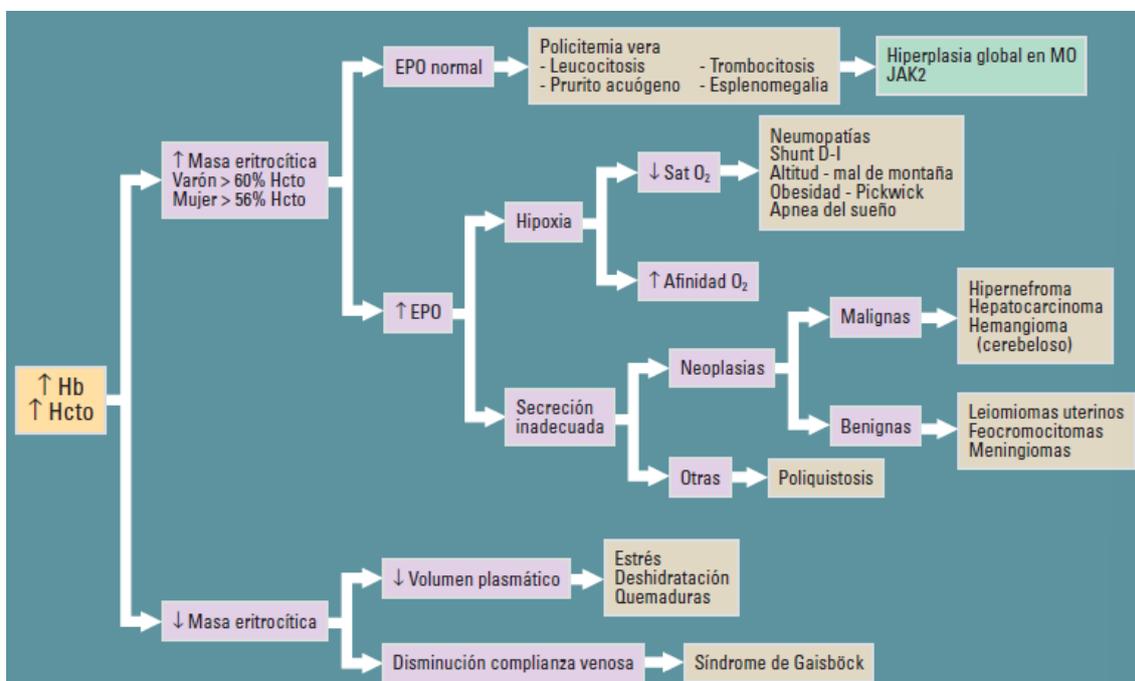


Figura 13. Algoritmo de diagnóstico de poliglobulia. Tomado de: Montes Gaisán C, 2012.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Bastos Oreiro M, Reinoso Pérez FL, de Paz Arias R, Hernández Navarro F. Protocolo diagnóstico de las anemias macrocíticas. *Medicine*. 2008;10:1368-70.
- Batlle A, Montes Gaisán C, González de Villambrosia S, Insunza A. Macrocitosis y anemias macrocíticas. *Medicine*. 2012;11:1193-201.
- Batlle A, Núñez J, Montes Gaisán C, Insunza A. Protocolo diagnóstico de las anemias normocíticas. *Medicine*. 2012;11:1238-41.
- Campuzano Maya G. Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. *Medicina & Laboratorio*. 2007;13(11-12).
- Carrasco Salas P, López Siles J. Caso Clínico: Paciente con anemia microcítica. *Ed Cont Lab Clín*; 18: 19 – 27; 2013.
- Duarte Romero M. Manual del hemograma y el frotis de sangre periférica. Bogotá: Universidad de los Andes, Facultad de Medicina, Ediciones Uniandes; 2013.
- González Hernández A. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 3ª ed. Elsevier; 2019.
- González Mesones B, González de Villambrosia S, Batlle A, Insunza A. Protocolo diagnóstico de las anemias hemolíticas. *Medicine*. 2012;11:1246-9.
- González Mesones B, González de Villambrosia S, Núñez J, Insunza A. Anemias hemolíticas congénitas. *Medicine*. 2012;11:1220-8.
- González de Villambrosia S, González Mesones B, Núñez J, Insunza A. Protocolo diagnóstico de las anemias microcíticas. *Medicine*. 2012;11:1242-5.
- González de Villambrosia S, Núñez J, González Mesones B, Insunza A. Trastornos del metabolismo del hierro y anemia ferropénica. *Medicine*. 2012;11:1202-11.
- Merino A. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE LOS ERITROCITOS. *Ed Cont Lab Clín*. 2015;20:41-64.
- Merino A. Manual de Citología Periférica. Primera edición. Grupo Acción Médica; 2005.

- Montes Gaisán C, Batlle A, González de Villambrosia S, Insunza A. Protocolo diagnóstico de la eritrocitosis. *Medicine*. 2012;11:1250-2.
- Montes Gaisán C, Batlle A, Núñez J, Insunza A. Conceptos básicos, aproximación diagnóstica y manejo extrahospitalario de la patología eritrocitaria. *Medicine*. 2012;11:1187-92.
- Montes Gaisán C, González Mesones B, Batlle A, Insunza A. Anemias hemolíticas adquiridas. *Medicine*. 2012;11:1212-9.
- Morales-Indiano C. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS. Ed Cont Lab Clín. 2017;28:53-71.

BLOQUE V

SESIONES DE MICROBIOLOGÍA

HEMOCULTIVOS

Autor: Maialen Palomino Alonso¹, Carmen Alhena Reyes Ruiz²

¹Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

²Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

Palabras clave: Hemocultivos, sepsis, microbiología

INTRODUCCIÓN

La detección de bacteriemia y fungemia constituye una de las prioridades del Servicio de Microbiología, dada la importancia diagnóstica y pronóstica. Son procesos vinculados a una mortalidad elevada, pudiendo presentarse entre el 10 y el 30% en función del tipo de paciente, el origen y el manejo inicial. La gravedad de esto requiere de la administración rápida de un tratamiento antibiótico empírico en función de los datos clínicos y de la epidemiología local de la resistencia antibiótica. Pero el porcentaje de tratamientos inadecuados ronda el 25-30%, lo que resulta verdaderamente importante en pacientes con enfermedades de base, procesos graves o centros con elevadas tasas de microorganismos multirresistentes.

- **Bacteriemia y fungemia:**

Se entiende que la bacteriemia como la presencia de bacterias en la sangre, que se pone de manifiesto por el aislamiento de las mismas en los hemocultivos. El origen puede ser diverso, como se describirá posteriormente.

La fungemia es la presencia de hongos en la sangre, generalmente de levaduras del género *Candida spp.* y que frecuentemente tienen su origen en la infección de catéteres.

Ambas infecciones se producen cuando los microorganismos invaden el torrente sanguíneo y se multiplican a un ritmo que supera la capacidad del sistema retículoendotelial para eliminarlos. La invasión puede producirse desde un foco infeccioso extravascular (capilares sanguíneos o de vasos linfáticos) o desde un foco intravascular (endocarditis, infección de catéteres intravenosos o arteriales).

La clasificación de la bacteriemia y fungemia es variable atendiendo a:

- El momento de aparición:
 1. Nosocomiales
 2. Comunitarias
 3. Asociadas a los cuidados sanitarios
- El origen:
 1. Primarias o de origen desconocido
 2. Secundarias a una infección localizada
- El patrón clínico:
 1. Transitorias: son las más frecuentes y aparecen al inicio de algunas infecciones bacterianas locales como neumonía, meningitis e infecciones urinarias complicadas, o en procedimientos en contacto con mucosas contaminadas.

2. Intermitentes: recurrencias periódicas por el mismo microorganismo y se traducen en la presencia de una infección localizada en espacios cerrados no drenados, como serían los abscesos intraabdominales.
3. Persistentes: suelen acompañar a una endocarditis u otras infecciones endovasculares (tromboflebitis supurada o la originada en un catéter intravascular infectado).

- **Sepsis¹:**

Disfunción orgánica grave que amenaza la vida de un paciente, causada por la respuesta anómala del individuo frente a la infección.

Ya que supone la principal causa infecciosa de muerte y puede afectar a más de 50.000 pacientes al año en nuestro país, pudiendo fallecer más de una tercera parte, se vio necesaria la creación de un código sepsis. El objetivo es la detección precoz junto con la aplicación de medidas para la monitorización y tratamiento de estos pacientes. Se activa en pacientes con signos de disfunción orgánica y sospecha clínica de infección. El código sepsis Incluye:

- El reconocimiento precoz de sepsis mediante el sistema quick-SOFA para el diagnóstico de sepsis y la escala SOFA para la cuantificación de la disfunción de órganos.
- Evaluación sistémica de la función de órganos (cardiovascular, neurológico, respiratorio, renal, hepático y coagulación) mediante:
 1. Valoración de las constantes vitales, diuresis y nivel de conciencia.
 2. Pruebas de laboratorio denominadas "perfil de sepsis" que incluyen:
 - Biomarcadores: sobre todo Procalcitonina (PCT), en su defecto Proteína C reactiva (PCR). Fuera del código sepsis hay descritos otros como la determinación de interleucinas (IL-6, IL-8) o la región medial de la proadrenomedulina (MRproADM).
 - Hemograma, junto con el valor del ancho de distribución de los monocitos (*Monocyte Distribution Width*, MDW) como marcador precoz de sepsis, además de coagulación, creatinina, urea, iones, bilirrubina total y directa.
 - Lactato.

- Gasometría arterial en caso de compromiso respiratorio, con frecuencia respiratoria alta, disnea o saturación arterial de oxígeno baja.
- Obtención de hemocultivos, en 2 extracciones obtenidas de venopunciones independientes y consecutivas, idealmente antes del inicio del tratamiento antimicrobiano, junto con la recogida de otras muestras clínicas representativas del probable foco de infección.

- **Generalidades del diagnóstico microbiológico:**

En relación al diagnóstico microbiológico, hay que tener en cuenta que durante un episodio de bacteriemia los microorganismos presentes en la sangre están en escasa cantidad. Suele oscilar entre 10 y 104 UFC/mL, pudiendo incluso ser inferior a 0,1 UFC/mL hasta en un 20% de los casos.

Esto hace que únicamente las técnicas muy sensibles puedan aplicarse en el diagnóstico rápido y no pueda utilizarse por ejemplo un examen directo de la sangre mediante tinciones.

Así el hemocultivo continúa siendo el principal método diagnóstico para determinar la etiología de la bacteriemia. Además, es el único método que permite el aislamiento del microorganismo viable, necesario para determinar su sensibilidad antibiótica.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ETIOLOGÍA

- **Bacteriemia y fungemia**

La bacteriemia y la fungemia de modo general, se presenta a cualquier edad, pero están especialmente predispuestos a sufrir estos procesos pacientes con enfermedades de base graves y los que están sometidos a maniobras que causan alteraciones de los mecanismos generales y locales de defensa frente a infecciones.

Las manifestaciones clínicas son variadas, pueden ir desde:

- Cuadros inaparentes, por un paso puntual a sangre de baja carga microbiana que el sistema inmune es capaz de atacar.
- Ya más relacionado con sepsis aparece la fiebre, tiritona, taquicardia, taquipnea o hiperventilación, hipertensión, alteración del estado mental. En ancianos pueden aparecer síntomas inespecíficos² (letargia, confusión, caídas, incontinencia, dolor abdominal, vómitos) que son difíciles de vincular.
- Shock séptico caracterizado por la presencia de fracaso multiorgánico.

Los focos más frecuentes de bacteriemia son el tracto genitourinario, heridas quirúrgicas, tracto gastrointestinal y catéteres intravasculares. Relacionado con la fungemia, el foco principal es el catéter. Sin embargo, en un 25% de los casos el foco originario no se llega a conocer

El diagnóstico definitivo se establece cuando se aísla el microorganismo causal en la sangre mediante cultivo. Los microorganismos más frecuentemente implicados en una bacteriemia general son:

- Bacteriemia en el adulto:
 1. Gram positivos: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp.
 2. Gram negativos: Los bacilos del orden Enterobacterales y otros bacilos gram negativos no fermentadores.
- Fungemia: principalmente *Candida albicans* ha sido la levadura que más frecuentemente ha sido aislada, pero en los últimos años ha ido aumentando la aparición de fungemias por otras especies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*.
- La bacteriemia en el niño ha ido sufriendo variaciones por la epidemiología local, por la política antibiótica y también por los programas de vacunación y los microorganismos emergentes:
 1. Durante el primer mes de vida, se asocia a bacterias de transmisión vertical: *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.
 2. Posteriormente, por adquisición comunitaria aparecen los patógenos *Streptococcus pneumoniae*, Enterobacterales, *Staphylococcus aureus* y *Neisseria meningitidis*. Con sospecha de artritis, hay que tener en cuenta a *Kingella kingae*.
 3. Los niños hospitalizados que frecuentemente portan catéteres intravasculares, es sencillo que desarrollen bacteriemia con origen en el catéter, encontrándose como causante estafilococos coagulasa negativa.
 4. En inmunodeprimidos hay que considerar también a *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida* spp.

Aunque esto ha sido una visión general, hay dos entidades particulares de la bacteriemia, la asociada a catéter y la endocarditis infecciosa, con una etiología y características definidas.

- **Bacteriemia/fungemia asociada a catéter:**

En pacientes hospitalizados es frecuente la presencia de catéteres vasculares, normalmente colocados en venas periféricas que supone poco riesgo ya que el periodo de utilización es corto. En aquellos pacientes donde los catéteres se colocan en venas centrales o en arterias sí que hay un riesgo elevado de complicaciones infecciosas locales o sistémicas.

Estos dispositivos se asocian con casi el 50% de las bacteriemias hospitalarias siendo la prevalencia publicada en 2016 por el EPINE (Estudio de prevalencia de la Infección Nosocomial en España) de 1,18 episodios por cada 100 enfermos.

La infección puede no presentar signos locales y con frecuencia el punto de inserción parece normal. Por esta razón, ante una bacteriemia sin otro foco evidente se debe considerar al catéter como principal responsable.

Las infecciones son normalmente causadas por estafilococos coagulasa negativa (generalmente *S. epidermidis*). Con menor frecuencia pueden serlo *S. aureus*, *Enterococcus* spp. y algunas especies de bacilos gram negativos o levaduras del género *Candida*.

● Endocarditis infecciosa (EI)

Es una enfermedad multiorgánica grave que se asocia con elevada mortalidad, en un 25% de los casos. La incidencia española ha sido estimada en 3,5 casos por cada 100.000 habitantes.

Se produce cuando los microorganismos, principalmente bacterias, infectan la superficie del endocardio. Afecta fundamentalmente a válvulas cardíacas, naturales o protésicas, pudiendo también afectar a dispositivos intracardiacos como desfibriladores o marcapasos. De este modo, el ser portador de material protésico intracardiaco es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de EI.

Se trata de un proceso complejo que involucra el daño tisular del endotelio cardíaco, junto con la virulencia del microorganismo y la inmunidad del paciente.

La patogenia de la enfermedad se asocia con una alteración previa de la superficie valvular que es colonizada por microorganismos tras una bacteriemia. Conforme los microorganismos proliferan, se va generando un daño del tejido valvular y la formación de una vegetación o verruga. La infección de la región cardíaca genera una bacteriemia continua de bajo grado, que puede producir infecciones a distancia, lo que se denomina metástasis infecciosas. De esta manera llega a afectar a otros órganos como cerebro, bazo, vértebras, ojos, etc.

Se puede manifestar de forma aguda o subaguda y afectar a válvulas naturales o protésicas. En el caso de que afecte a válvulas protésicas puede ser precoz (antes de los 12 meses de la cirugía de implantación) o tardía (después de los 12 meses de la implantación). Esto es importante para valorar la etiopatogenia de la enfermedad, relacionada con el mecanismo de adquisición, durante la cirugía de recambio válvulas o por una bacteriemia posterior.

En cuanto a la etiología, es muy variable y dependiente de varios factores, bien relacionados con el paciente (área geográfica, nivel socioeconómico, edad, enfermedades de base, origen nosocomial o comunitario, etc.), con el tipo de válvula afectada, presencia de material protésico o uso de catéteres permanentes.

- Hasta un 80% de los casos están causados por bacterias gram positivas de los géneros *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp.
 1. En las últimas décadas ha habido un descenso de los casos de *Streptococcus* spp. del grupo viridans y un aumento de *Staphylococcus* spp. tanto de *S. aureus* (patógeno más frecuente actualmente) como estafilococos coagulasa negativa. Esto está asociado al incremento del número de pacientes portadores de material protésico intracardiaco y mayor uso de catéteres.
 2. La proporción de casos por *Enterococcus* spp. y el grupo *Streptococcus bovis* también está en aumento. Se cree que se debe al incremento de edad de los pacientes y a la presencia de patología intestinal subyacente.

- En un 5% de los casos se encuentran bacterias gram negativas:
 1. En su mayoría del grupo HACEK: *Haemophilus* spp., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* y *Kingella kingae*.
 2. Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* en raras ocasiones
 3. El por *Brucella* spp. actualmente es muy infrecuente.
- En un 1,5% de los casos se encuentran bacterias difíciles de cultivar y que se vinculan a hemocultivos negativos: *Coxiella burnetii*, *Tropheryma whipplei*, *Bartonella hensalae* y *Bartonella quintana*. Su diagnóstico depende en gran medida del empleo de métodos microbiológicos no basados en el cultivo, fundamentalmente serología y métodos moleculares.
- En un 1% de los casos se aíslan bacterias anaerobias.
- En un 2,5% levaduras generalmente del género *Candida*.
- La polimicrobiana es poco frecuente, un 1,5% de los casos.
- Otros microorganismos: micobacterias no tuberculosas (*Corynebacterium* spp., *Listeria monocytogenes* y *Propionibacterium acnes*) en casos puntuales y muy raramente infecciones asociadas a *Chlamydia* spp., *Legionella* spp. o *Mycoplasma* spp.

HEMOCULTIVOS

● Indicaciones:

Aunque no hay una recomendación universal sobre las indicaciones de la toma de hemocultivos, generalmente se aconseja su extracción ante la presencia de:

- Escalofríos y fiebre, con temperatura corporal igual o superior a 38°C.
- Hipotermia en neonatos o ancianos, o bien cuando haya decaimiento súbito, ya que estas poblaciones pueden no presentar signos y síntomas típicos.
- Casos de leucopenia, leucocitosis o trombopenia no relacionada con procesos hematológicos.
- Cuando haya signos de sepsis o de infección focal en pacientes susceptibles de padecer meningitis, osteomielitis, pielonefritis, infección intraabdominal, artritis, infecciones graves de la piel y tejidos blandos o neumonía.
- Sospecha de endocarditis.

El cultivo de la sangre debe complementarse con muestras de otras localizaciones donde se sospecha del origen para determinar el foco del proceso.

● Frascos empleados:

Distintas empresas diseñan diferentes frascos con especificaciones concretas, pero en general los frascos se diseñan para aislamiento de bacterias aerobias/anaerobias facultativas y para anaerobios facultativos/estrictos. También

se han optimizado para pequeños volúmenes, necesarios en pediatría, y se han generado otros selectivos para micobacterias (medio Middlebrook 7H9) u hongos, para casos más específicos.

Se ha ido reemplazando los frascos de vidrio por plástico para evitar accidentes en caso de rotura. Todos frascos en general contienen medios de cultivos enriquecidos con diferentes nutrientes que utilizan como anticoagulante el SPS (polianetol sulfonato de sodio). Este además neutraliza la actividad bactericida del suero e inhibe la acción de ciertos antibióticos, como aminoglucósidos y polimixinas.

Además, incluyen partículas de carbón o resinas que neutralizan el efecto de antibióticos. Las resinas también son capaces de neutralizar los componentes de la cascada del complemento de la sangre. Algunos medios de crecimiento incorporan agentes líticos que favorecen la recuperación de microorganismos incluidos en el interior de fagocitos.

A la hora de la extracción de las muestras, hay que tener en cuenta diversos aspectos:

- Extracción de las muestras:

Es importante una buena técnica y formación del personal para que la toma de la muestra permita obtener y diferenciar el microorganismo implicado. Además de evitar las contaminaciones, que no deben suponer más de un 3% de los hemocultivos procesados.

- Tipo de extracción:

Venopunción (extracción periférica). Solo se realizan extracciones de catéter cuando haya sospecha de infección en el mismo, que además debe ir acompañada de una muestra periférica. Si además llega a retirarse el catéter, debe enviarse para cultivo junto con los hemocultivos dentro de los 30 minutos siguientes a la extracción del mismo.

- Momento de extracción:

En el caso de una infección aguda debe coincidir con el momento que existan mayor número de bacterias viables en sangre. Esto se sabe que es el momento que precede a la aparición de la fiebre, por lo que se recomienda extraer cuando haya escalofríos (preceden al pico febril y aparece a la hora de haber entrado el microorganismo en el torrente sanguíneo). En el caso de endocarditis, como la bacteriemia que se produce suele ser continua, de bajo grado, persistente y no siempre está asociado a picos febriles, la toma de las muestras no tiene por qué coincidir con la fiebre.

Además, debe realizarse antes de iniciar la administración del tratamiento antibiótico y si no es posible, cuando el antibiótico esté en concentración valle, es decir antes de la siguiente dosis.

- Volumen de sangre:

Es el factor más importante para aumentar el rendimiento diagnóstico. Donde es importante tener en cuenta la dilución de la sangre en el medio de cultivo para neutralizar las propiedades bactericidas sanguíneas y el posible tratamiento antimicrobiano. El volumen de sangre sí que es muy importante en el caso de la endocarditis, por ser bacteriemia de bajo grado, siendo idealmente 10mL por frasco en adultos

en al menos tres parejas de frascos. El volumen requerido está relacionado con el peso del paciente:

1. Niños pequeños, requieren entre 1 y 5mL (dilución 1:5) inoculados en un solo frasco aerobio.
 2. Niños mayores y adultos, entre 10-20mL (dilución 1:10) repartidos en dos frascos, uno aerobio y otro anaerobio.
- Número de hemocultivos:

La posibilidad de recuperar el agente causal aumenta con el número de hemocultivos extraídos: 60-80% en el primer hemocultivo, 80-90% con dos hemocultivos y 95-99% añadiendo el tercer hemocultivo.

1. Adultos: dos o tres frascos en sepsis aguda o en infecciones a distancia, y tres o cuatro si hay sospecha de endocarditis, infección de dispositivos protésicos o infección de catéter, ya que es difícil diferenciar entre contaminación e infección verdadera.
2. Niños: un hemocultivo aerobio, ya que diversos estudios han demostrado que el riesgo de la población pediátrica de desarrollar bacteriemia por anaerobios es mucho menor que en la población adulta.

- Intervalo de tiempo entre cada extracción:

No hay una recomendación universal, pero se recomienda que estén separadas entre 10-30 minutos. En casos de extrema urgencia o para no retrasar el tratamiento antibiótico pueden extraerse los hemocultivos simultáneamente en extremidades diferentes.

- Metodología a seguir:

En todos los hospitales existen protocolos de la metodología a seguir para la toma de la muestra, siendo fundamental:

1. Utilización de guantes y mascarilla
2. Limpieza con clorhexidina de los tapones de los viales y de la piel del paciente. No tocar la piel del paciente con la mano.
3. Inoculación primero del frasco anaerobio evitando la entrada de aire y pinchando el tapón de forma perpendicular. Inocular posteriormente el frasco aerobio y el resto de tubos (bioquímica, coagulación etc.)
4. Agitar suavemente los frascos y lavar los tapones de nuevo.
5. Transporte de forma urgente al laboratorio, y si no fuera posible, mantener a temperatura ambiente.

● **Transporte, recepción y conservación:**

Las muestras deben enviarse rápidamente al laboratorio conservándose en todo momento a temperatura ambiente. Las guías del CLSI recomiendan que se introduzcan en el incubador en menos de 2 horas desde su extracción, ya que se notifica una disminución de la recuperación de patógenos si se mantienen mucho tiempo a temperatura ambiente.

Nunca se deben introducir en estufa o en nevera. Si se incuban previamente en estufa podría ocasionar que cuando el frasco se introduzca en el incubador ya haya llegado a la fase de crecimiento estacionaria y no se detecte como positivo. Por otro lado, si se mantienen en nevera, se genera

un retraso en el crecimiento bacteriano y esto afecta a la viabilidad de los microorganismos.

Dada la importancia del diagnóstico, generalmente no se rechaza ningún hemocultivo salvo que haya dudas en la identificación de las muestras.

- **Procesamiento de hemocultivos:**

Hace unas décadas, los hemocultivos se procesaban de manera manual y se utilizaban frascos con medio bifásico de Ruiz Castañeda. Actualmente se utilizan sistemas automatizados de lectura continua que han demostrado mayor eficiencia.

Estos sistemas de incubación automatizados son diferentes según la casa comercial. Todos tienen en común que mantienen una temperatura de unos 36°C +/-1°C, presentan una serie de celdas individuales con agitación continua que promueve la multiplicación bacteriana y realizan una monitorización periódica para la detección de frascos positivos. Los modelos más avanzados son:

- Sistema BD BACTECTM FX:

Detecta el crecimiento bacteriano mediante un sensor fluorimétrico de gases integrado en el vial del hemocultivo. Se mide el nivel de fluorescencia emitido por cada vial, que se corresponde con la cantidad de CO₂ liberado por el microorganismo.

- Sistema BacT/Alert® VIRTUOTM³

Se basa en tecnología colorimétrica. Los Sensores de Emulsión de Líquidos (SEL) especializados en la parte inferior de cada frasco de cultivo cambian visiblemente de color cuando cambia el pH debido al aumento de CO₂, conforme es producido por los microorganismos.

Los equipos miden los cambios de color cada diez minutos y analizan esos cambios. Como características a destacar:

1. Presenta carga automatizada, activada por movimiento y mediante una cinta transportadora se introducen y extraen los frascos en el sistema. El área de carga permite incluir hasta 40 frascos a la vez.
2. El equipo es modular y cada módulo tiene una capacidad de 432 celdas, por lo que es la cantidad de frascos que puede tener cargados a la vez.
3. Presenta una tecnología de escaneado en 360°. Reconoce el frasco y las etiquetas, percibe el nivel de llenado y permite la trazabilidad. Además, presenta un sistema de alerta para detectar la existencia de un defecto o exceso de volumen de sangre inoculada.
4. Los sofisticados algoritmos, incluyendo un único algoritmo "umbral", garantizan la detección precoz de microorganismos.
5. Los frascos positivos emiten una alerta y permiten la descarga bajo demanda o automatizada. Los frascos negativos los descarta automáticamente en la bandeja extraíble de residuos.

Durante el procesamiento de hemocultivos para el aislamiento de bacterias habituales, los principales factores

que pueden afectar a la positividad de los frascos de hemocultivos son:

- Volumen de sangre inoculado.
- Administración de antimicrobianos previo a la extracción de la muestra.
- Atmósfera de incubación escogida.
- Retraso de la incubación.
- Duración de la incubación.

El 85-90% de los hemocultivos son positivos en menos de 48h, salvo en casos de fungemias o bacteriemias causadas por bacterias de crecimiento lento.

De este modo, los frascos se incuban 5 días hasta informarlos definitivamente como negativos y que se descarte el frasco del analizador. Con este tiempo se pueden recuperar la mayoría de microorganismos, incluso algunos de crecimiento algo más lento. Este tiempo debe ser prolongado en caso de sospecha de endocarditis (se recomienda prolongar hasta 14 días si es negativo), ya que puede estar causada por bacterias de crecimiento lento o exigente como las del grupo HACEK, *Brucella* spp., *Abiotrophia* spp., etc. O también cuando se sospecha de la presencia de hongos, micobacterias, *Legionella* spp., *Bartonella* spp. o *Nocardia* spp. Pero cuando se incrementa el tiempo de incubación hay que tener en cuenta que también se aumenta la posibilidad de recuperar contaminantes.

Hay bacterias cuyo aislamiento conlleva unos requerimientos especiales, donde si hay una alta sospecha clínica de infección por estos patógenos se pueden realizar unas actuaciones particulares para su aislamiento:

- Brucelosis.
- Tularemia.
- *Leptospira* spp.
- *Bartonella* spp.
- *Legionella* spp.
- Bacterias deficientes en pared.
- *Campylobacter* spp. y *Helicobacter* spp.
- *Tropheryma whipplei*.
- *Rickettsia* spp.
- CGP con requerimientos nutricionales especiales.
- *Treponema pallidum*.
- Micobacterias.

En el caso de los hongos, el procesamiento de los hemocultivos presenta algunas particularidades. Las levaduras del género *Candida* son responsables de la mayoría de las fungemias. Clásicamente *C. albicans* era la especie con mayor relevancia clínica, pero están apareciendo con mayor frecuencia otras especies del género.

Aunque las levaduras pueden crecer bien en los frascos de hemocultivos, únicamente la mitad de las veces que se sospecha de la patología la prueba es positiva. Esto es

debido a que los monocitos y otras células del sistema inmune lisan las células fúngicas; puede haber un inóculo muy bajo; o puede tratarse de fungemias transitorias o intermitentes. La sensibilidad de la técnica se incrementa mucho con el volumen de sangre inoculado. Algunos autores proponen una extracción extra de un frasco específico para hongos ya que se ha demostrado que mejora notablemente el porcentaje de recuperación, especialmente de *C. glabrata*.

La mayoría de los hongos se aíslan en los tres primeros días de incubación, sin embargo *C. glabrata* y *Cryptococcus neoformans* presentan un crecimiento más lento. Se aconseja aumentar el tiempo de incubación de los frascos si tras 5 días permanecen negativos y hay alta sospecha clínica de fungemia.

Las levaduras tienen una temperatura de crecimiento óptimo de 37°C, pero los hongos filamentosos crecen mejor a temperaturas más bajas (27-30°C). De este modo, sumando a que hay pocas células fúngicas en sangre en invasiones por hongos filamentosos, la recuperación en frascos aerobios en cultivo convencional es muy complicada. Además, resulta cuestionable su implicación en la clínica cuando se aíslan ya que pueden suponer una contaminación ambiental. Si se sospecha de infección por hongo dimórfico o filamentosos es recomendable prolongar la incubación hasta 30 días a 22-30°C y realizar un subcultivo antes de descartarlo como negativo.

● Procedimiento tras hemocultivos positivos:

Los hemocultivos se deben procesar en cuanto el sistema comunique su positividad. Es muy recomendable que se procesen e informen durante las 24 horas del día y todos los días de la semana. Cada hospital tiene su protocolo, pero aquí se detalla el realizado en nuestro centro, donde en primer lugar en campana se realiza:

- Extensión y fijación de sangre en portaobjetos para el examen microscópico mediante tinción Gram. Observándolo al microscopio a 100x aumentos, anotando gram positivos/negativos, morfologías y todas las características que puedan ayudar a orientar la especie. Se informa el resultado que a priori se considere bacteriemia significativa: bacilos gram negativos, cocos gram positivos en 2 o más sets o bacilos gram positivos en 2 o más sets.
- Primer subcultivo, inoculando 1 o 2 gotas de sangre extraída del frasco siempre en agar sangre, agar chocolate y agar Schaedler (para anaerobios).

Posteriormente, según el resultado del gram se hace un segundo cultivo también de la botella original, pero en otras placas selectivas. En algunos centros se realiza también un antibiograma rápido a partir de botella que podrá dar resultados de sensibilidad preliminares. Pasadas 3-4h de la siembra del hemocultivo positivo, también es posible apreciar un velo de crecimiento bacteriano, a partir del cual se hace una identificación precoz.

Las placas se incuban a 37°C y las que se siembran en agar chocolate a 37°C y en atmósfera con 5-10% de CO₂. Se revisan a las 24h, manteniéndolas más tiempo si resultan negativas para poder diferenciar bacterias de crecimiento lento de falsas positividades.

En función de los resultados obtenidos en el gram, cada hospital establece un protocolo para el procesamiento de los subcultivos directos de botella positiva, siendo en nuestro centro (Figura 1):

- Bacilos gram negativos:
 1. Siembra de una placa de MacConkey (MK) por cada botella positiva.
 2. Siembra de dos placas de Mueller Hinton por paciente (por cada set positivo), donde se incluyen los siguientes antibiogramas manuales:
 - MH (1): tira de E-test de Cefotaxima y Meropenem (en neonatos Gentamicina en lugar de Cefotaxima). Permite el cribado de mecanismos de resistencia que requieran vigilancia epidemiológica (BLEE, carbapenemasa).
 - MH (2): Técnica de disco-placa para lectura rápida (4h, 6h u 8h) poniendo discos de Piperacilina-Tazobactam, Gentamicina, Tobramicina, Amikacina, Meropenem, Ciprofloxacino, Cefotaxima y Ceftazidima. La lectura se realiza a las 4h, 6h u 8h según el protocolo RAST validado por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) en abril de 2022.
- Bacilos gram positivos. No se realiza ninguna prueba más, ya que no suele ser necesario un antibiograma precoz. Suelen ser contaminantes, pero en caso de aparición en varios sets de hemocultivos se realiza identificación con MALDI-TOFF y se valora clínicamente su implicación.
- Cocos gram positivos en racimos. Siembra en un medio de cultivo cromogénico (SAID) por set que permite distinguir *S. aureus* de otras especies de estafilococos coagulasa negativa. En esta placa se realiza el antibiograma manual con un disco de Cefoxitina para cribar la resistencia a metilina por adquisición del gen *mecA*, lo cual implica resistencia a todos los betalactámicos a excepción de Ceftarolina y Ceftobiprol.
- Cocos gram positivos en cadenas. En la placa ya sembrada de agar sangre se incluye un disco de optoquina en la descarga del inóculo. Sirve para identificar a *Streptococcus pneumoniae* que es sensible y eso lo distingue de otros estreptococos o enterococos.
- Diplococos gram negativos. Se debe sospechar de la presencia de *Neisseria meningitidis* o *N. gonorrhoeae*. Las placas ya sembradas de agar sangre y agar chocolate se dejan más tiempo incubando si las placas son negativas a las 24h.
- Levaduras. Si hay sospecha de fungemia por el gram o por la sintomatología del paciente, se debe incluir además una placa selectiva para hongos (agar Sauboreaud).

Con una identificación preliminar del velo de crecimiento de 3-4h por MALDI-TOFF y con la realización del antibiograma rápido de botella de hemocultivo, el servicio de Microbiología puede informar de unos resultados de sensibilidad preliminares y alertar al clínico para optimizar la antibioterapia del paciente.

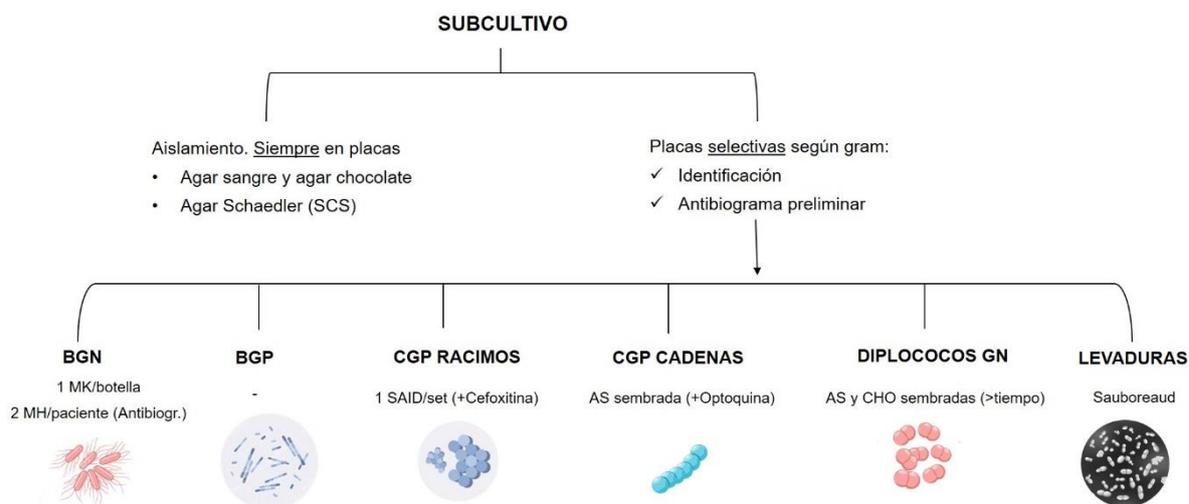


Figura 1. Esquema del protocolo de subcultivo realizado en el Hospital 12 de Octubre tras la positividad del hemocultivo. Elaboración propia

La identificación y el antibiograma completo definitivo se realizan a las 24h de incubación de las placas originales. Si se sospechara de algún mecanismo de resistencia transmisible tanto en el antibiograma preliminar como en el definitivo, habría que desplegar las pruebas microbiológicas y las alertas correspondientes con el fin de que el paciente sea vigilado y aislado para prevenir la aparición de brotes nosocomiales.

• Interpretación de resultados:

Ya con la identificación del microorganismo y el conocimiento de su patrón de resistencia antibiótica, es momento de la interpretación de los resultados.

Una interpretación óptima requiere del conocimiento de la situación clínica del paciente, enfermedad de base, comorbilidades, tratamientos antimicrobianos administrados, etc. Por lo que es imprescindible revisar la historia clínica del paciente junto con una continua comunicación con los peticionarios para poder realizar una valoración conjunta de los casos.

Una de las cuestiones principales cuando se detecta positividad en un hemocultivo es saber diferenciar entre contaminación e infección.

El *National Healthcare Safety Network* (NHSN) define hemocultivo contaminado, es decir, falso positivo como aquel en el que se aíslan especies propias de la microbiota comensal de la piel o propios del medio ambiente:

- Microorganismos de baja virulencia como *Aerococcus*, *Micrococcus* o *Propionibacterium* (*P. acnes*).
- Estafilococos coagulasa negativa.
- Algunos estreptococos del grupo viridans.
- La mayoría de las especies de los géneros *Bacillus* o *Corynebacterium* (excepto *C. jeikeium*).
- Otros, como *Lactobacillus* o *Clostridium perfringens*.

En todos los hospitales debe vigilarse el porcentaje de hemocultivos contaminados y realizar actividades formativas periódicas. Una contaminación puede suponer la

administración de un tratamiento innecesario, con las complicaciones que conlleva, además de realización de pruebas diagnósticas extra y un aumento de estancia hospitalaria, lo que supone un aumento de costes y perjuicios al paciente.

Según la guía IDSA (*Infectious Disease Society of America*) del 2013, la contaminación de los hemocultivos se considera un indicador de calidad asistencial y no debe superar el 3% de hemocultivos totales recibidos. La tasa de contaminación se correlaciona inversamente con el volumen de sangre. También se correlaciona con el lugar de la punción, la venopunción periférica se asocia a menor contaminación que el acceso arterial o los accesos venosos centrales.

Hay varios parámetros que pueden ayudar a identificar el significado de un hemocultivo positivo cuando se sospecha de contaminación:

- El número de extracciones positivas con respecto al total de las efectuadas. En el caso de los niños, es más difícil esta diferenciación ya que únicamente se les extrae un hemocultivo, así que se deben extremar las precauciones de contaminación. Ante la duda se extraen nuevos hemocultivos para confirmación.
- El sitio de toma de la muestra: catéter o punción venosa.
- La identidad del microorganismo, que como se ha descrito anteriormente hay especies que tienen poca probabilidad de provocar una bacteriemia verdadera.
- El tiempo hasta la positividad y el tiempo de diferencia de positividad entre pares recogidos en diferentes sitios. En estafilococos coagulasa negativa: tiempo $\leq 15h$ indica valor clínico y si es de $\geq 22h$ sugiere contaminación.

En relación al tiempo de positividad, en la bacteriemia asociada a catéter se utiliza la técnica del tiempo diferencial de positividad para valorar si el foco de la bacteriemia es el catéter. Se trata de comparar el tiempo que tardan los distintos frascos en dar un resultado positivo, comparando el tiempo de los frascos extraídos en sangre periférica con los obtenidos a través de cada luz del catéter.

Si el foco es el catéter, el inóculo bacteriano inicial será mayor, por lo que alcanza la positividad antes, con una diferencia de al menos 120 minutos respecto al obtenido en sangre periférica.

Si se realiza correctamente alcanza una sensibilidad y una especificidad elevadas, pero si no se realiza bien puede llegar a conclusiones erróneas.

Este parámetro está bien validado en bacterias, pero ocasiona más duda en caso de infecciones por levaduras, ya que el crecimiento es más lento. Para *Candida glabrata* por ejemplo se plantea un tiempo diferencial de 6 horas.

Además, si el recambio o la eliminación del catéter son posibles, se tiene que enviar junto con el hemocultivo el catéter para su cultivo y así visualizar crecimiento microbiano, con lo que conjuntamente poder determinar su implicación en la bacteriemia.

CONCLUSIONES

Una de las prioridades de los servicios de Microbiología es un diagnóstico rápido y certero de las bacteriemias y fungemias, para poder dar soporte a todos los pacientes que ingresen con esta sospecha clínica.

Un diagnóstico rápido y correcto de estos procesos contribuye a disminuir la mortalidad que se les asocia, además de mejorar la utilización de los antimicrobianos, que conlleva a una disminución de aparición de resistencias antibióticas, junto con una reducción del gasto sanitario. El hemocultivo es el principal método diagnóstico y que permite obtener el microorganismo viable para realizar el antibiograma.

Tras la positividad del hemocultivo deben ponerse en marcha todas las medidas necesarias para disponer de la mayor cantidad de información posible en un tiempo inferior a 6 horas. Esto es fundamental para el correcto manejo del paciente. El volumen de sangre es el factor más importante para aumentar el rendimiento diagnóstico del hemocultivo. Es además muy importante el distinguir un verdadero positivo de una contaminación, donde las contaminaciones deben suponer <3% de los hemocultivos recibidos (indicador calidad asistencial).

Además, la transmisión de la información debe ser de forma urgente y preferiblemente automatizada, junto con la elaboración de grupos de trabajo multidisciplinares con los especialistas encargados del manejo de la patología.

Es muy importante el procesamiento de los hemocultivos y la información de resultados las 24 horas del día y todos los días de la semana, para no demorar la adaptación del tratamiento antimicrobiano y optimizar su utilización.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

1. Palencia Herrejón E, González Del Castillo J, Ramasco Rueda F, Candel FJ, Sánchez Artola B, von Wernitz Teleki A, *et al.* Documento de consenso para la implantación y desarrollo del Código Sepsis en la Comunidad de Madrid. *Rev Esp Quimioter.* 2019;32(4):400-409.
2. Cisneros-Herreros JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez-Baño J, Salavert-Lletí M. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. *Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).* *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25(2):111-130.
3. BACT/ALERT® VIRTUO®. Equipo automatizado para hemocultivos. [Internet]. BioMérieux España. [citado 27 junio 2023]. Disponible en: <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/bactalertr-virtuor#top>

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Rodríguez Díaz JC, Guna Serrano R, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M. 62. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. 2017. Rodríguez Díaz JC (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.
- Ardanuy C, Cercenado E, Morosini MI, Torres C. 39. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. Morosini MI (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2011

PARÁSITOS DE INTERÉS CLÍNICO: PROTOZOOS Y HELMINTOS

Autor: Jesús Cabanes Madrid, Pilar Duarte García, Laura Carrasco Parrón

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

Palabras clave: Protozoos, Helmintos, Malaria

INTRODUCCIÓN

El parasitismo es un tipo de asociación biológica en donde uno de los organismos, llamado parásito, depende de otro, llamado hospedador, para su supervivencia. En la mayoría de los casos, el hospedador recibe un daño o perjuicio por parte del parásito en algún momento de su ciclo biológico, dando lugar a la parasitosis o enfermedad parasitaria.

En la actualidad, se está incrementando el número de individuos afectados por parásitos importados, debido al aumento de flujo de personas entre países por la inmigración, el trabajo o el turismo. Concretamente, las parasitosis importadas que más frecuentemente afectan a la población en España son, entre otras, las parasitosis intestinales, la malaria y la enfermedad de Chagas. Por ello, es fundamental en el campo de la microbiología el desarrollo de estrategias terapéuticas y de cribado que permitan controlar y prevenir estas enfermedades infecciosas parasitarias.

Existen diversas clasificaciones de los parásitos, cada una de ellas atendiendo a distintos criterios. Por ejemplo, se pueden agrupar en función del tipo de ciclo biológico que presentan para su desarrollo:

- **Parásitos monoxenos:** son aquellos de ciclo biológico directo, es decir, el completo desarrollo del parásito se realiza en un único hospedador, sin hospedadores intermediarios.
- **Parásitos heteroxenos:** son aquellos de ciclo biológico indirecto, es decir, que presenta dos o más hospedadores.
- **Parásitos autoheteroxenos:** aquellos en cuyo ciclo biológico el mismo hospedador se comporta como intermediario y definitivo, pero a distintos niveles, por ejemplo, en órganos diferentes.

Los parásitos que afectan a los humanos y que se destacan en el presente capítulo son los protozoos, pertenecientes al reino *Protozoa*, y los helmintos, pertenecientes al reino *Metazoa* (metazoos).

PROTOZOOS

• Introducción:

Los protozoos son organismos eucariotas unicelulares. Presentan orgánulos típicos, como el núcleo o el retículo endoplasmático, y una cualidad característica de este tipo de seres vivos es que presentan, a niveles generales, dos formas de vida: la forma de resistencia, denominada quiste, y la forma de crecimiento, denominada trofozoíto.

Su transmisión puede ser directa entre hospedadores o indirecta, a través de agua y alimentos contaminados o a través de vectores (normalmente artrópodos).

Su reproducción puede ser asexual, ya sea por bipartición, gemación o esporulación, o sexual, donde se unen gametos haploides formando un nuevo organismo diploide.

Dentro del reino de los protozoos, se encuentran distintos grupos de microorganismos, entre los que destacan: las amebas, los flagelados, los ciliados y los apicomplejos o coccidios.

• Amebas:

- Generalidades:

Las amebas son un grupo de protozoos con las siguientes características:

1. **Ciclo biológico:** Presentan un ciclo biológico sencillo con dos fases, la fase de crecimiento y con movilidad (el trofozoíto) y la de resistencia o infecciosa (el quiste).
2. **Reproducción:** Se replican por fisión binaria del trofozoíto.
3. **Movimiento:** Se desplazan mediante la emisión de pseudópodos.

- Clasificación:

Las amebas se pueden clasificar atendiendo a su patogenicidad en:

1. **Amebas comensales:** No producen enfermedades en humanos, como *Entamoeba dispar*.
2. **Amebas de vida libre:** Se encuentran en el suelo y agua de piscinas y pueden ser patógenos oportunistas en humanos, como *Naegleria fowleri*.
3. **Amebas patógenas:** *Entamoeba histolytica* es la única ameba intestinal reconocida como patógena para el ser humano.

- *Entamoeba histolytica*:

Esta ameba es la causante de la infección conocida comúnmente como amebiasis. Su infección es más frecuente en entornos de pobre saneamiento.

La infección por este protozoo se adquiere por la ingestión de comida o agua contaminada con los quistes del parásito. Tras su ingesta se liberan los trofozoítos, los cuales colonizan el intestino grueso. Una vez allí, los trofozoítos se multiplican y la mayoría de ellos se convierten en quistes, que a través de las heces vuelven al medio ambiente y son inmediatamente infecciosos, terminando así el ciclo.

Aproximadamente el 90% de los pacientes son asintomáticos, pero en el otro 10% de los infectados, los trofozoítos consiguen penetrar en la mucosa intestinal usando proteasas y glicosidasas causando enfermedad sintomática. Estos síntomas en su mayoría se basan en dolor abdominal y diarrea acuosa y sanguinolenta y, en raras ocasiones, el individuo puede desarrollar una enfermedad extraintestinal.

Para el diagnóstico, se pueden observar directamente los quistes y trofozoítos bajo el microscopio. También se puede realizar estudio serológico en caso de enfermedad extraintestinal y estudios moleculares, como la PCR, que ofrecen mayor sensibilidad. Cabe destacar que una de las especies comensales, *Entamoeba dispar*, es una especie no patógena indistinguible a nivel morfológico de *E. histolytica*, por lo que para diferenciarlas se debe recurrir a pruebas inmunológicas o genéticas, por ejemplo. Respecto al tratamiento, el fármaco de elección es el metronidazol.

- **Ciliados:**

- ***Balantidium coli*:**

El único parásito ciliado que infecta a los seres humanos es *B. coli*. Esta especie causa un cuadro que se asemeja a la amebiasis de *E. histolytica*, y presenta un ciclo biológico también similar al de este protozoo: se ingieren los quistes a través de agua y alimentos contaminados, los trofozoítos colonizan el intestino grueso y finalmente los quistes maduros e infectantes salen al exterior junto con las heces.

- **Flagelados:**

Los protozoos flagelados, como su propio nombre indica, son aquellos que presentan flagelo. Se pueden clasificar en 3 grandes grupos: protozoos flagelados del tracto digestivo, entre los que destaca *Giardia lamblia*, del tracto urogenital, entre los que destaca *Trichomonas vaginalis* y los hemático-tisulares, entre los que destacan *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y el género *Leishmania*.

- ***Giardia lamblia*:**

G. lamblia, *G. intestinalis* o *G. duodenalis*, es el principal protozoo flagelado causante de infección en el ser humano. Es de distribución mundial, con mayor prevalencia en países en vías de desarrollo y es de transmisión fecal-oral.

Su ciclo biológico comienza al ingerirse agua o alimentos contaminados con los quistes del parásito. El ácido del estómago favorece la rotura del quiste a nivel del duodeno, y allí los trofozoítos se multiplicarán y se unirán a las vellosidades del intestino delgado, dando lugar a la característica diarrea con malabsorción de la giardiasis.

El diagnóstico de elección se basa en la observación microscópica de los trofozoítos y/o quistes, y el principal tratamiento de elección es el metronidazol.

- ***Trichomonas vaginalis*:**

Se trata de un protozoo cuyo trofozoíto presenta 5 flagelos. No presenta quistes, por lo que el trofozoíto es la forma infectante y su única forma de vida, y los humanos son su único reservorio.

Las manifestaciones clínicas en las mujeres se basan en una vaginitis con descarga purulenta y picor. En cambio, en los hombres puede causar uretritis, pero no es común, sino que frecuentemente son portadores asintomáticos, aunque diseminadores de la enfermedad. Por tanto, se trata de una enfermedad de transmisión sexual.

El diagnóstico se basa principalmente en un examen microscópico en fresco de las secreciones vaginales en mujeres o uretrales de ambos sexos o mediante técnicas moleculares (PCR). Por último, el tratamiento principal de elección es el metronidazol.

- ***Trypanosoma brucei*:**

Es el agente causante de la tripanosomiasis humana africana (THA), conocida más comúnmente como enfermedad del sueño. Los agentes etiológicos de esta enfermedad son *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, dos subespecies de *T. brucei* morfológicamente indistinguibles. La forma clínica producida por *T. brucei rhodesiense* es más grave y rápida.

Esta especie presenta dos formas de vida, llamadas tripomastigote y epimastigote. El tripomastigote es la única forma biológica observada en los mamíferos, mientras que los epimastigotes son formas de desarrollo que se observan en el vector.

Concretamente, esta enfermedad es transmitida por la picadura de la mosca tsé-tsé (del género *Glossina*). El ciclo comienza con la picadura de la mosca, a través de la cual penetran los tripomastigotes, localizados en la saliva de la mosca, hasta la sangre y la linfa, pudiendo diseminarse hasta alcanzar el sistema nervioso central. Una vez allí, se multiplican en estos 3 medios, hasta que el vector vuelve a picar y obtiene sangre infectada con el tripomastigote sanguíneo. Una vez en el intestino del vector, el tripomastigote pasa a la forma de epimastigote, que es capaz de migrar a las glándulas salivares, donde vuelve a transformarse en el tripomastigote infectante.

Respecto a la clínica de la enfermedad, es característico a los pocos días que en el sitio de la picadura aparezca una reacción dérmica conocida como chancro. En una primera etapa, que se corresponde con la fase hemolinfática, se presentan episodios de fiebre muy elevada durante varios días, separados por periodos afebriles y debilidad intensa. La segunda etapa, que se corresponde con la fase neurológica, se da cuando el parásito atraviesa la barrera hematoencefálica e invade el sistema nervioso central. En ella se producen cambios en el comportamiento y cansancio extremo. Es típico el llamado signo de la llave, o signo de Kerandel, basado en una hipersensibilidad táctil del individuo. En la fase final el paciente entra en coma, proceso que le termina produciendo la muerte.

El método de referencia para el diagnóstico de la tripanosomiasis humana africana es la detección del parásito en sangre, aspirado de ganglios linfáticos o en la zona del chancro. Respecto al tratamiento, depende tanto de la subespecie infectante como de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el individuo.

- *Trypanosoma cruzi*:

El protozoo flagelado *T. cruzi* es el agente causante de la infección conocida como la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana.

Esta especie presenta tres formas de vida: el amastigote, que es la forma intracelular que se observa en los tejidos, el tripomastigote que es la forma infectante, y el epimastigote que se localiza en el intestino del vector.

En este caso, el vector es la chinche besucona (género *Triatoma*). A diferencia de *T. brucei*, los tripomastigotes infectantes de *T. cruzi* no se localizan en la saliva sino en las heces del vector. Por tanto, el ciclo biológico de este parásito comienza cuando la chinche pica y defeca en la piel del individuo. El acto reflejo de rascarse en la picadura permite la penetración del microorganismo a través de la herida. Una vez dentro, el tripomastigote migra a órganos como el corazón o el hígado, penetra en las células y pasa a la forma de amastigote, y en su interior se multiplica. Algunos de estos amastigotes vuelven a transformarse en tripomastigotes, los cuales pueden infectar otros tejidos y volver a convertirse en amastigotes, o pasar al torrente sanguíneo, donde serán ingeridos por la chinche en una segunda picadura. En el interior del insecto se transforman en epimastigotes, que migran hasta el intestino posterior del vector, donde se transforman en los tripomastigotes infectantes, volviendo al inicio del ciclo.

Respecto a la clínica, la primera etapa se basa en una reacción cutánea en el sitio de la picadura, llamada en este caso chagoma. Si la picadura fuese cercana al ojo, se produce también una reacción inflamatoria conjuntival, con edema en los párpados de uno de los ojos (signo de Romaña). Tras esta etapa aguda, y si el individuo infectado no ha sido tratado, la infección se cronifica, siendo asintomática durante décadas o de por vida. Transcurridas unas décadas, aproximadamente la mitad de los infectados evolucionan a las formas sintomáticas. Las alteraciones que se presentan dependen de los órganos afectados, pudiendo llegar a desarrollar cardiomegalia, megaesófago y megacolon o afectación del sistema nervioso, entre otros síntomas.

En una infección aguda, el diagnóstico de elección más adecuado es la observación directa de los tripomastigotes en una muestra de sangre. Cuando la infección evoluciona a la cronicidad, la determinación de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* ofrecerá más información. Por último, el principal tratamiento de elección es el benznidazol.

- *Leishmania spp.*:

El género *Leishmania* incluye diversas especies, causantes de distintos cuadros clínicos englobados en el término de leishmaniasis.

Este parásito presenta dos formas de vida: el promastigote, que es la forma infectante, y el amastigote que es la forma intracelular que se encuentra en el interior de los macrófagos.

El ciclo comienza con la picadura del vector, que en este caso es un insecto flebótomo, que inyecta junto con su saliva a los promastigotes infectantes. Una vez que penetran en la sangre, son fagocitados principalmente por macrófagos. Sin embargo, los promastigotes son capaces de evadir su

respuesta inmune, y en su interior se diferencian a la forma de amastigote. Los parásitos continuarán multiplicándose en su interior, los macrófagos se lisarán y los amastigotes infectarán otros macrófagos de diferentes tejidos. En una nueva picadura del vector, el mosquito ingerirá sangre junto con macrófagos infectados. En su aparato digestivo los amastigotes se liberarán y se transformarán en promastigotes, que migrarán al órgano bucal del vector, y allí serán capaces de infectar nuevamente.

En la leishmaniasis, las formas clínicas dependen de la especie causante de la infección y del estado inmunológico del individuo infectado. Existen tres distintas:

1. **Leishmaniasis cutánea:** Es la forma clínica más común. Se basa en la aparición de lesiones ulcerativas en el sitio donde se ha producido la infección.
2. **Leishmaniasis mucocutánea:** En esta enfermedad, las personas afectadas sufren destrucción del tejido bucal y nasofaríngeo, pudiendo llegar a causar una mutilación facial desfigurante.
3. **Leishmaniasis visceral:** Es la forma más grave de la enfermedad, mortal en ausencia de tratamiento. Está causada por *L. donovani* en Europa. Los principales órganos afectados son el bazo, el hígado y la médula ósea. Se caracteriza por fiebre, hepatoesplenomegalia, y pancitopenia principalmente. Esta forma clínica se encuentra más frecuentemente asociada a pacientes inmunodeprimidos con SIDA.

El diagnóstico de la leishmaniasis se realiza principalmente por PCR. También pueden observarse de forma directa los amastigotes en tejidos o aislando los promastigotes en cultivo. En el caso de la leishmaniasis visceral, el diagnóstico serológico por inmunofluorescencia indirecta es de las técnicas diagnósticas más empleadas. (detección de anticuerpos anti-promastigotes). Por último, existe un tratamiento distinto según el tipo de leishmaniasis.

• Apicomplejos

Su nombre se deriva del complejo de orgánulos que presentan en el extremo apical en algunas etapas sus ciclos de vida, involucrado en la penetración de otras células. En el presente capítulo se destacan los géneros *Toxoplasma*, *Plasmodium* y *Babesia*.

- *Toxoplasma gondii*:

Este protozoo se transmite por ingestión de alimentos contaminados con sus quistes. El hospedador definitivo es un felino, normalmente un gato. En su interior se desarrollan los quistes, y a través de las heces pasan al medio ambiente donde terminan de madurar.

La mayoría de las infecciones son asintomáticas. El desarrollo de la sintomatología se encuentra asociado principalmente a inmunodeprimidos causándoles, entre otros síntomas, fiebre, déficit motor, coriorretinitis o encefalitis. Además, los trofozoítos son capaces de atravesar la barrera placentaria: la infección congénita puede llegar a causar abortos durante el primer trimestre de embarazo y, si afecta más tarde de ese periodo, puede provocar lesiones cerebrales o coriorretinitis.

El diagnóstico de elección de la toxoplasmosis es mediante estudio serológico.

- ***Plasmodium spp.:***

Es el agente etiológico del paludismo o malaria. Existen cinco especies de *Plasmodium* que causan enfermedad en el hombre: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*.

En los últimos informes a nivel mundial de la malaria, se detalla que en el año 2017 hubo 219 millones de casos de paludismo, y la cifra estimada de muertes ese mismo año fue de 435.000.

El ciclo biológico de *Plasmodium* incluye fases de reproducción sexual y asexual. La infección en humanos comienza con la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles*, por la cual se introducen los llamados esporozoítos a la sangre. Estos esporozoítos se diseminan al hígado, infectando a los hepatocitos. En su interior, se diferencian y se replican dando múltiples merozoítos, que se encuentran contenidos en una especie de "bolsa" que contiene a dichos merozoítos y que se conoce como esquizonte. La rotura tanto del hepatocito como del esquizonte lleva a la liberación al torrente sanguíneo de los merozoítos (existen especies de *Plasmodium* que permanecen durante meses o años en una etapa latente en los hepatocitos, y esos esporozoítos pasan a llamarse hipnozoítos, que pueden dar lugar a recidivas de la infección meses o años después).

Los merozoítos liberados a la sangre infectan a los eritrocitos. Muchos de estos merozoítos se replicarán asexualmente y formarán de nuevo un esquizonte, con posterior rotura de los eritrocitos y liberación de nuevos merozoítos (este ciclo eritrocitario ocurre cada 1-3 días). A su vez, otros merozoítos evolucionarán a los gametocitos masculino y femenino, que son las formas infectantes del mosquito. Una vez que se ingieren en una segunda picadura del mosquito, ambos gametocitos se fusionan formando un cigoto, que se desarrolla hasta formar los esporozoítos del inicio del ciclo.

Los síntomas de la malaria se basan principalmente en malestar general, fiebre o debilidad intensa. La fiebre puede ocurrir en forma de paroxismos porque coincide con la rotura de los eritrocitos y liberación de parásitos a la sangre. Dichos paroxismos pueden tener una periodicidad cada 48 horas o cada 72 horas.

Entre los hallazgos analíticos destaca la trombocitopenia (es la alteración más frecuente, hasta en el 80-85% de casos), anemia normocítica por destrucción de los hematíes y leucopenia. Respecto a parámetros bioquímicos, la LDH y la bilirrubina pueden estar aumentadas, y en casos graves destaca la acidosis con la elevación de lactato.

El método diagnóstico de elección es el examen microscópico de sangre venosa periférica que permite identificar la presencia de parásitos en sangre. Además, ofrece información sobre el índice de parasitemia (determina la gravedad de la infección), el estadio en el que se encuentran los parásitos y la especie infectante de *Plasmodium*, para lo cual es importante conocer sus diferentes características morfológicas.

Por último, cabe destacar que, para evitar la infección, la principal profilaxis es la quimioprofilaxis, mediante la administración de los fármacos antipalúdicos antes y después del viaje a zonas endémicas.

- ***Babesia spp.:***

Es el agente causante de la babesiosis o piroplasmosis y se transmite principalmente por picadura de garrapata. Presenta, al igual que las especies de *Plasmodium*, un ciclo biológico con las formas de esporozoítos y merozoítos. Una de las principales particularidades de este parásito es que los merozoítos, cuando se encuentran en el interior de los eritrocitos, pueden aparecer cuatro unidos en forma de cruz de Malta, lo cual es muy característico de este protozoo.

HELMINTOS

- **Generalidades:**

A diferencia de los protozoos, los helmintos son organismos pluricelulares, habitualmente macroscópicos. Con frecuencia presentan estructuras de fijación como ventosas, y es característica la presencia de eosinofilia en el hemograma durante una infección por este tipo de seres vivos.

A su vez, dentro de los helmintos se pueden encontrar tres grandes grupos: trematodos, cestodos y nematodos, cada uno con características morfológicas diferentes. Muchos de ellos presentan ciclos de vida más complejos que los de los protozoos, presentando algunos incluso dos hospedadores intermediarios. Además, en general, las formas de vida de los helmintos son más diversas, pasando primero la mayoría de ellos por un estado de huevo, del cual sale una larva, que pasa por distintos estadios de desarrollo larvarios hasta alcanzar la forma biológica de gusano adulto.

En el presente capítulo se destacan dos de los helmintos más relevantes: *Strongyloides stercoralis* y *Enterobius vermicularis*.

- ***Strongyloides stercoralis:***

Es un helminto perteneciente al grupo de los nematodos. Presenta un ciclo biológico particular al presentar dos formas de infección, la heteroinfección y la autoinfección, y presentar vida libre además de vida parasitaria.

Existen dos tipos de larvas en el desarrollo de este parásito: larva rhabditiforme y larva filariforme. La forma infectante es la larva filariforme. La larva rhabditiforme puede madurar hasta la larva filariforme infectante, o madurar directamente hasta gusano adulto, que es capaz de reproducirse y dar lugar a más larvas rhabditiformes.

En la heteroinfección, el ciclo se inicia con la larva rhabditiforme siendo eliminada a través de las heces del individuo. La larva rhabditiforme madura en el exterior y se transforma en la forma filariforme. Esta infecta al hospedador penetrando a través de la piel, hasta que accede a la circulación sanguínea y llega hasta el pulmón. Una vez allí asciende por el árbol bronquial hasta llegar a la faringe, donde son deglutidas, pasando finalmente al intestino delgado, siendo este el lugar en el que alcanzan el estado de gusanos adultos. Una característica para destacar de las

hembras es que son ovovivíparas, porque ponen huevos en su interior, eclosionan y paren a las larvas rhabditiformes, que son expulsadas al medio ambiente por las heces, volviendo al inicio del ciclo.

A su vez, pueden desarrollar el fenómeno de la autoinfección, que es una característica biológica propia de esta especie. Se basa en que las larvas rhabditiformes pueden también madurar a larvas filariformes en el propio intestino del hospedador. Por tanto, estas larvas filariformes no hace falta que salgan al exterior y penetren de nuevo a través de la piel, sino que directamente penetran la mucosa intestinal, produciendo la autoinfección. Al estar reactivándose el ciclo continuamente se produce lo que se conoce como hiperinfección, característico de *S. stercoralis* (Figura 1).

La clínica depende, entre otros factores, del grado de inmunodepresión que presenten los individuos infectados. Aproximadamente la mitad de los pacientes

inmunocompetentes son asintomáticos durante años, y cuando se dan manifestaciones clínicas son de tipo gástrico (dolor abdominal y diarrea), cutáneo (aparición de exantemas) o debido a la eosinofilia asociada a clínica respiratoria por el paso de las larvas por el área pulmonar (síndrome de Loeffler). Por otro lado, los pacientes inmunodeprimidos tienden a desarrollar cuadros mucho más graves de estrongiloidosis y con una alta mortalidad, aunque se administre tratamiento, por el llamado síndrome de hiperinfección.

El diagnóstico definitivo se establece al detectar larvas de *S. stercoralis* en heces, aunque se suelen eliminar en escasa cantidad por lo que no es muy sensible la técnica. Las pruebas serológicas presentan mayor sensibilidad que el estudio directo en heces, con un alto valor predictivo negativo, y también destaca la PCR a tiempo real. Su principal tratamiento es la ivermectina.

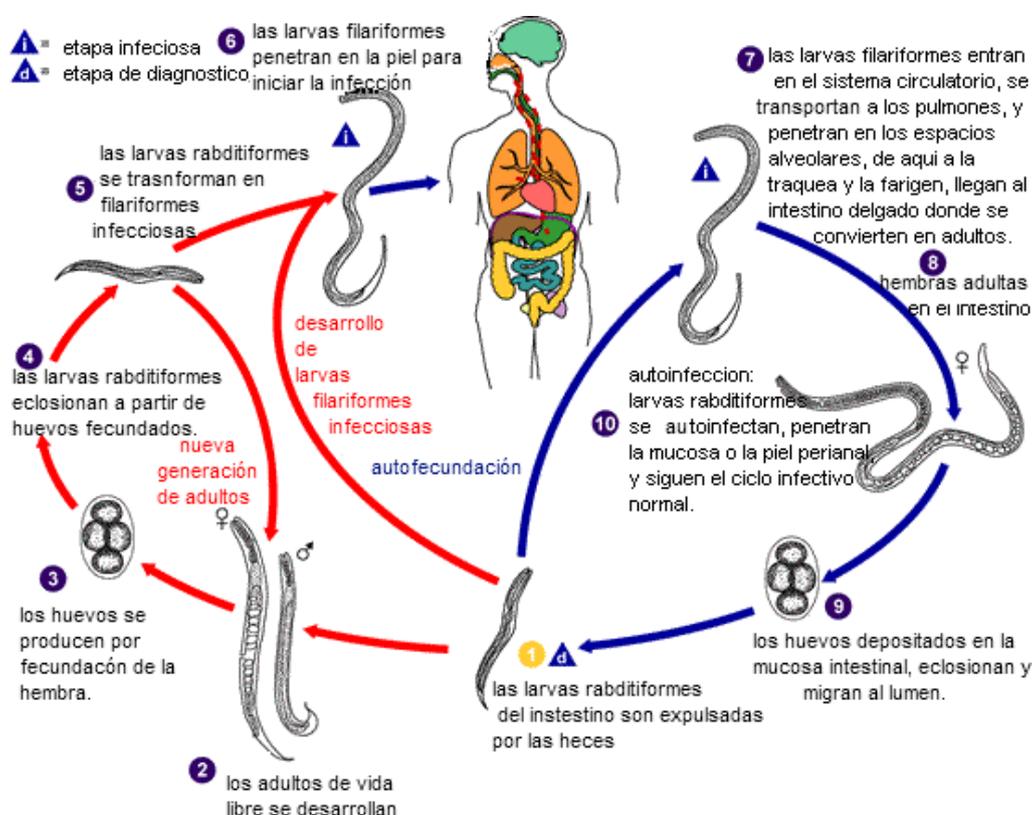


Figura 2. Ciclo de vida de *S. stercoralis*. Traducida de DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern

- ***Enterobius vermicularis*:**

Es un nematodo intestinal, conocido también como oxiuro, y es el agente etiológico de la enterobiasis u oxiuriasis.

Su ciclo biológico comienza por la toma de alimentos o agua o por contacto con objetos o manos contaminadas con huevos del parásito. Una vez ingeridos, la larva se libera a nivel del intestino delgado, y llega a la fase de adulto en la parte inicial del intestino grueso. Durante la noche, las hembras fecundadas migran a la zona perianal donde depositan los huevos.

La mayoría de pacientes son asintomáticos. Comenzará a sospecharse de oxiuriasis en aquellos individuos,

fundamentalmente niños y ancianos, que presenten prurito anal, sobre todo nocturno. Al rascarse por el picor, eso conduce a que los huevos se alojen también debajo de las uñas, lo que facilita la autoinfección posterior. Los casos que presenten una alta carga parasitaria podrán desarrollar otros síntomas como náuseas y vómitos principalmente.

El método más sensible y específico para el diagnóstico es el uso de la cinta de Graham. Es una cinta adhesiva transparente para recoger los huevos del parásito, que se pega sobre un portaobjetos de cristal y posteriormente se observa bajo el microscopio. Se recomienda adherirla a la zona perianal por la mañana ya que los huevos se depositan de madrugada, y para aumentar la sensibilidad es

aconsejable realizar esta prueba de forma seriada debido a la irregularidad de las migraciones del parásito hembra. Respecto a la morfología, los huevos tienen una forma característica: aplanada por un lado y con una membrana doble que contiene un embrión completamente formado. Finalmente, el principal tratamiento de este protozoo es el albendazol o mebendazol.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Álvarez-Martínez M.J. et. al. Diagnóstico de parasitosis importadas en España- En: Cercenado Mansilla E., Cantón Moreno R. Procedimientos en Microbiología Clínica. España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2020
- Murray P.R. Microbiología médica. 7ª edición. Elsevier; 2013
- Picazo J. J., Prieto Prieto J. Compendio de Microbiología clínica. 2ª ed. España: Elsevier; 2016
- Rivero Z, Villarreal L, Bracho A, Prieto C, Villalobos R. Identificación molecular de *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en niños con diarrea de Maracaibo, Venezuela. *Biomédica*. 2021; 41 (1)
- Romero Cabello R. Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª Edición. Médica Panamericana; 2007
- Theel E.S., Pritt B.S. Parasites. *Microbiology Spectrum* 2016; 4(4): 1-53
- Turrientes MC, López-Vélez R. Aspectos prácticos del diagnóstico de laboratorio y profilaxis de la malaria. Madrid: Unidad de Medicina Tropical y Parasitología Clínica. Hospital Ramón y Cajal; 2000

