



Año 2018

Guía de Estudio de
Trabajo Práctico
**PROTEÍNAS PLASMÁTICAS
Y LABORATORIO DEL
METABOLISMO DE LOS
HIDRATOS DE CARBONO**



DOCENTES

JTP Malvasi, Graciela Noemi

JTP Dusse Graciela Viviana.

Auxiliar 1ra Formichela Maria Mercedes.

Auxiliar Egresada Ad-Honoren Medina Magali Ivana

Auxiliar Alumna Ad-Honoren Servian Araceli Beatriz.

Prof. Adj. Galeano Zulema.

Prof. Adj. Malarczuk Elba Cristina.

INDICE

INTRODUCCION	3
LABORATORIO DE LAS PROTEINAS TOTALES	4
DESCRIPCION DE LAS PRUEBAS.	
I. Proteinemia (Proteínas Totales Séricas)	6
II. Albuminemia (Albumina Sérica)	7
III. Técnicas de separación de Proteínas	8-17
Interpretacion del Proteinograma	19-23
Identificación de Proteínas	24-26
Cuantificación de Proteínas	27-28
ANEXO	29-30
BIBLIOGRAFIA	31
LABORATORIO DEL METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO	
Introducción	3
Laboratorio	3-4
Consideraciones en las diferentes etapas	
Etape pre analítica, analítica y Post analítica	5-9
Laboratorio en el control y seguimiento de pacientes	9-16

con DM

Detección y control en diabetes Pregestacional y 17-21

Gestacional

Pruebas de Diagnóstico Diferencial. 22-26

Bibliografía 27

Anexo 28

Glosario 29

INTRODUCCION

Las proteínas están presentes en todas las células y en los distintos líquidos corporales: suero o plasma (6-8 g/dl)*, orina (< a 30 mg/24hs)* y LCR (15-45 mg/dl)*.

(*) Valores de referencia para adultos.

En cuanto al lugar donde cumplen su función las proteínas plasmáticas, podemos diferenciar:

- **Proteínas plasma específicas:** componentes habituales del plasma, entre ellas albuminas y globulinas.
- **Proteínas no plasma específicas:** aquellas que aparecen en el plasma liberación de otras células. Ej: Fosfatasa alcalina, Creatinfosfokinasa, entre otras.

El principal lugar de síntesis es el hepatocito (albumina, α y beta globulinas), mientras que las gamma globulinas son sintetizadas por las células plasmáticas.

En relación a sus funciones, las proteínas plasmáticas se pueden clasificar en:

- **Proteínas con función de transporte y asociados a sistemas buffer.**
- **Proteínas reactantes de fase aguda** (se llaman así porque en situaciones de stress, procesos inflamatorios o traumatismos aumentan su concentración).
- **Proteínas sintetizadas por el sistema inmunocompetente.**

CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	
Grupos o sistemas de proteínas	Cantidad
Inmunoglobulinas	5
Sistema complemento	19
Sistema de coagulación y fibrinólisis	16
Inhibidores de las proteinasas	13
Apolipoproteínas	14
Proteínas involucradas en el metabolismo lipoprotéico	5
Proteínas de transporte	12
Proteínas de función desconocida	16
Enzimas y otras proteínas	>10

Mientras que, en cuanto a sus características de solubilidad y desplazamiento electroforético, se las puede clasificar en fracciones:

- **Albumina**
- **Globulinas:** α_1 , α_2 , beta y gamma.

La determinación de proteinemia, y de sus diferentes fracciones, sirve como **guía en el diagnóstico y tratamiento de diversas situaciones clínicas**.

Proporcionan información relacionada a:

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

LABORATORIO: PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

El estudio de las proteínas plasmáticas (PP) abarca las determinaciones descritas en la Tabla N°1, son determinaciones programadas. En situaciones de Urgencias se solicita Proteinemia/Albuminemia.

Los protocolos de estudio, pueden iniciarse *con*:

- Proteinemia y Proteinograma, de este último se informa el valor de la Albuminemia.
- Proteinemia, Albuminemia, y posteriormente el Proteinograma.

El **algoritmo Diagnóstico a seguir** dependerá siempre del patrón electroforético del PTGR que presente la muestra en estudio, más la sospecha clínica. En base al mismo, se deberá proceder a cuantificar y/o identificar la proteína específica y/o fracción.

Instrucciones al paciente para la toma de muestra

Estudios programados: en condiciones basales (post descanso nocturno y ayuno de 8 horas).

Estudios de Urgencias: no se cumple las condiciones basales, son las condiciones del momento de la extracción sanguínea.

Muestra biológica: Suero.

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

Tabla N°1: **Determinaciones de Laboratorio en el estudio de Proteínas Plasmáticas**

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	FUNDAMENTO/MÉTODO	INFORMACIÓN
I. Proteinemia (Proteínas totales séricas)	I. <u>Reacción del Biuret:</u> Colorimétrico de punto final.	Concentración de Proteínas totales séricas
II. Albuminemia (Albumina sérica)	II. <u>Fijación de colorante:</u> Método colorimétrico	Concentración de Albumina sérica
	<u>Electroforesis convencional</u>	

III. Técnicas de separación de proteínas.**	<p>Proteinograma electroforético</p> <p><u>Electroforesis capilar</u></p> <p>Capilar en gel</p> <p>Capilar de zona</p> <p>Enfoque isoeléctrico</p> <p>Isotacoforesis</p>	<p>Fracciones proteicas:</p> <p>Concentración de Albumina y Globulinas ($\alpha_{1,2}$; beta $_{1-2}$; gamma)</p>
IV. Identificación de proteínas	<p>Inmunolectroforesis</p> <p>Inmunofijación</p>	Componente monoclonal
V. Cuantificación de proteínas	<p>Inmunodifusión Radial</p> <p>Turbidimetría</p> <p>Nefelometría</p>	<p>Concentración de:</p> <p>Inmunoglobulinas (GAM)</p> <p>Transferrina,</p> <p>Hemopexina</p> <p>Haptoglobina</p> <p>Otras</p>

** Mediante la Electroforesis (EF) pueden evidenciarse variaciones en la concentración de proteínas en las distintas fracciones, que podrán apoyar al diagnóstico en diferentes situaciones clínicas (Descritas en Interpretación del Proteinograma)

DESCRIPCION DE LAS PRUEBAS.

I. PROTEINEMIA-PROTEÍNAS TOTALES SERICAS (PT)

Para el dosaje de PT, se cuenta con métodos físicos y químicos (Tabla Nº 2). En el área de química clínica se utilizan los métodos químicos.

La concentración proteica es una limitante a la hora de elegir el método más adecuado. Es por ello que los **métodos turbidimétricos** (donde se forma un precipitado mediante adición de tricloroacético (TCA) o ácido sulfosalicílico) se utilizan a menudo para intervalos de concentración entre 5-150 mg/dl aproximadamente, que se corresponde con las concentraciones habituales en orina o LCR. En cambio, el **método de Biuret**, permite determinar concentraciones mayores (como las presentes en suero o plasma), y es por ello que es muy utilizado tanto en los métodos manuales como en automatizados.

Tabla Nº 2: **Clasificación de los Métodos**

MÉTODOS	FUNDAMENTO
FISICOS	<p>Absorbancia del enlace peptídico a 190 nm</p> <p>Absorbancia de los aac. Aromáticos a 280 nm</p> <p>Refractometría</p>
QUIMICOS	<p>Reacción de Kjeldahl</p> <p>Método de Lowry</p> <p>Fijación a colorantes</p> <p>Precipitación con ácido TCA o Sulfosalicílico</p> <p>Reacción del Biuret</p>

REACCION DEL BIURET: Método colorimétrico de punto final

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



Muestra biológica: Suero

Condiciones de reacción, Procedimiento, Interferencias: Ver inserto del reactivo a utilizar en el trabajo práctico.

Valores de referencia:

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

Significado clínico en base a los valores de referencia, se interpreta como:

- **Normoproteinemia:** concentración de PT dentro de los *valores de referencia*.
- **Hiperproteinemia:** aumento de la concentración por encima del límite superior del *valor de referencia*. Mecanismos generales: deshidratación o aumento de la síntesis de proteínas específicas.
- **Hipoproteinemia:** disminución de la concentración por debajo del límite inferior del *valor de referencia*. Mecanismos posibles: defectos en la síntesis proteica, grandes pérdidas o catabolismo proteico excesivo.

II. ALBUMINEMIA-ALBUMINA SERICA

Los fundamentos generales de los métodos de dosajes de albumina sérica, son descriptos en la Tabla N°3

Tabla N° 3: **Métodos**

- Fijación de colorantes, *Método Colorimétrico de punto final*
- Cuantificación por fraccionamiento electroforético (PTGR)
- Formación de complejos específicos albúmina-anticuerpos.

Método de FIJACIÓN DE COLORANTES: Método colorimétrico de punto final

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

Muestra biológica: Suero

Condiciones de reacción, Procedimiento, Interferencias: Ver inserto del reactivo a utilizar en el trabajo práctico.

Valores de referencia:

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

Significado clínico

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

En base a los valores de referencia, interpretamos como **HIPOALBUMINEMIA**, cuando se presentan valores por debajo del límite inferior. Pueden deberse a: pérdida excesiva de proteínas (síndrome nefrótico, quemaduras severas), infecciones prolongadas, enfermedad hepática, desnutrición.

NOTA: NO existe aumento absoluto de albúmina, **SI aumento relativo** en caso de reducción del contenido de agua plasmática (Ej. Deshidratación, vómitos, otros)

III.TECNICAS DE FRACCIONAMIENTOS DE PROTEINAS

Las **fracciones proteicas** pueden variar en el transcurso de un gran número de entidades, lo que conlleva a que la cuantificación de las mismas tenga valor diagnóstico considerable.

PROTEINOGRAMA - ELECTROFORESIS (EF) DE PROTEINAS PLASMATICAS**Fundamento:**

La **electroforesis** es una técnica donde se separan partículas cargadas mediante la aplicación de un campo eléctrico. Las partículas cargadas negativamente (*anión*) migran hacia el polo positivo (ánodo), mientras que, las cargadas positivamente (*catión*) migran hacia el electrodo negativo (cátodo).

Los factores que influyen en la movilidad electroforética son:

1. Parámetros externos:

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

2. Parámetros relacionados al solvente y al sistema electroforético:

- *Muestra*: está constituida por partículas de diferente **tamaño, forma y carga eléctrica**
- *Tipo de soporte*
- *Tampón o buffer*: determina el pH del sistema, lo que a su vez determina la **carga eléctrica** de las partículas.

Los aminoácidos, y por lo tanto las proteínas, son **compuestos anfóteros** (*actúan como sustancias buffer*) que se comportan como *ácidos* (ceden protones y quedan con carga negativa) o *bases* (captan protones y quedan con carga positiva) dependiendo del medio en el que estén. Esto hace que puedan separarse las distintas **fracciones de proteínas**.

La *fuerza iónica (u)* del buffer es la *concentración de iones que hay en el mismo* y es importante, porque cuando es baja, permite velocidades de migración de los solutos más rápidas y con menor desprendimiento de calor.

NOTA: El pH al que un aminoácido (aa) no se comporta ni como ácido ni como base se denomina punto isoeléctrico (PI). En estas condiciones la estructura del aa no posee carga neta.

Los PI varían desde 3 a 10, sin que exista un pH al que todos los aa sean neutros.

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

En soluciones muy ácidas todos los aa aparecen como cationes, mientras que en soluciones muy básicas los aa se encuentran en forma aniónica.

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

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

Tipos de electroforesis:

1. Electroforesis de frente móvil o libre: actualmente en desuso
2. *Electroforesis de zona, metodología convencional*: soportes sólidos: papel, acetato de celulosa o gel (agarosa, poliacrilamida, entre otros)
3. Electroforesis capilar

Medios de soporte sólido:

1. **PAPEL DE FILTRO:** la muestra queda sobre la superficie y avanza a lo largo de ella, con escasa fricción, por lo que la separación depende fundamentalmente de la magnitud de la **carga** de cada componente de la muestra. Es un soporte sencillo, pero con elevada adsorción debido a los grupos hidroxilo de la celulosa. Ha dejado de utilizarse por el **efecto electroendosmótico** que se produce.

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

El **número de bandas** que pueden apreciarse en el PTGR dependerá siempre del soporte que se utilice y las condiciones en que se realice la electroforesis. Cuando se utilizan *tiras de acetato de celulosa* normalmente se observan **cinco bandas** (si se manejan las condiciones pueden alcanzarse a ver **seis bandas**, que correspondería a beta 1-glob. y beta 2-glob.), mientras que, cuando se utilizan geles de alta resolución (como poliacrilamida) pueden distinguirse muchas más bandas.

ETAPAS DE LA ELECTROFORESIS

1. **Separación** electroforética mediante un campo eléctrico
2. **Fijación** de las proteínas sobre el soporte
3. **Revelado** de las proteínas para identificar su presencia y separación, se realiza mediante colorantes ácidos, Negro Amido 10B, rojo Ponceau, que se fijan sobre los grupos básicos de las proteínas. El exceso del colorante se elimina con mezclas, metanol-acético-agua destilada, sin que este arrastre el colorante fijado a las proteínas.

4. **Cuantificación** de las fracciones electroforéticas, puede realizarse a través de: Evaluación visual, Elución y Densitómetros (Fotómetros especiales)

METODOLOGÍA MANUAL, ELECTROFORESIS CONVENCIONAL

Muestra biológica:

- Suero del paciente
- Suero control

Equipos: Cuba electroforética, Fuente de Poder, Sembrador



Reactivos:

1. Tira de acetato de celulosa
2. Buffer a pH: 8,6
3. Colorante: Negro Amido 10 B
4. Decolorante

Conservación de las tiras de Acetato de Celulosa (cellogel): El envase comercial es un sobre herméticamente cerrado, que contiene como solución conservante *metanol al 40 %*. Una vez abierto el sobre original, conservar las tiras de acetato de celulosa en alcohol metílico al 40 %, en recipiente cerrado y refrigerado.

Consideraciones: La siembra de la muestra se realiza sobre la superficie *opaca* de la tira de cellogel. El corte indicativo de la tira debe quedar sobre el puente del lado del cátodo y a la derecha del operador.

DESARROLLO DE LA EF:

Paso 1: Sacar las tiras del alcohol al 40 %, secar (entre papeles de filtro) y sumergir en la solución buffer a usar en la corrida a temperatura de ambiente, durante 15 minutos.

Paso 2: Al cumplir el tiempo del paso 1, sacar, secar (entre papeles de filtro), y colocar en el puente de la cuba, de manera que la parte opaca este ubicada hacia arriba, extendida perfectamente y que sus extremos se sumerjan en el buffer (pH: 8,6), tapar.

Paso 3: *Siembra:* Destapar y proceder a sembrar el suero control y paciente, con los sembradores (dispositivos específicos, que poseen distintas medidas: micro, semi-micro y macro), tapar.

Paso 4: *Electroforesis:* Conectar la fuente, seleccionar un campo eléctrico de 200 voltios, durante aproximadamente 35 minutos. Observar el frente de corrida.

Un detalle a tener presente para ver si circula la corriente es observar que la tapa de la cuba, se ve empañada.

Paso 5: *Coloración:* Sacar, cortar las tiras de manera de mantener el punto de siembra y el frente de corrida dejando un margen. Y respetar los puntos originales del marcado de la tira de acetato. Recordar marcar a la tira con algún corte que le permita identificar a las distintas muestras. Colocar en la solución colorante de Negro de Amido B, por 5 minutos, homogenizar constantemente.

Paso 6: *Decoloración:* Colocar la tira en solución decolorante, con homogenización constante. Realizar este procedimiento de manera de ir cambiando la solución decolorante, a fin de obtener una tira libre de colorante, quedando únicamente las fracciones donde las proteínas estén coloreadas mediante el fenómeno de fijación del colorante a las proteínas.

Observación: cada solución decolorante, deber ser reciclada y deben colocarse números, de manera que, los frascos van del 1 al 6 y la intensidad de la coloración deber ir disminuyendo (en degradé, de coloración fuerte a nula)

Paso 7: *Cuantificación, según método:*

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

7.2 Cuantificación por elución

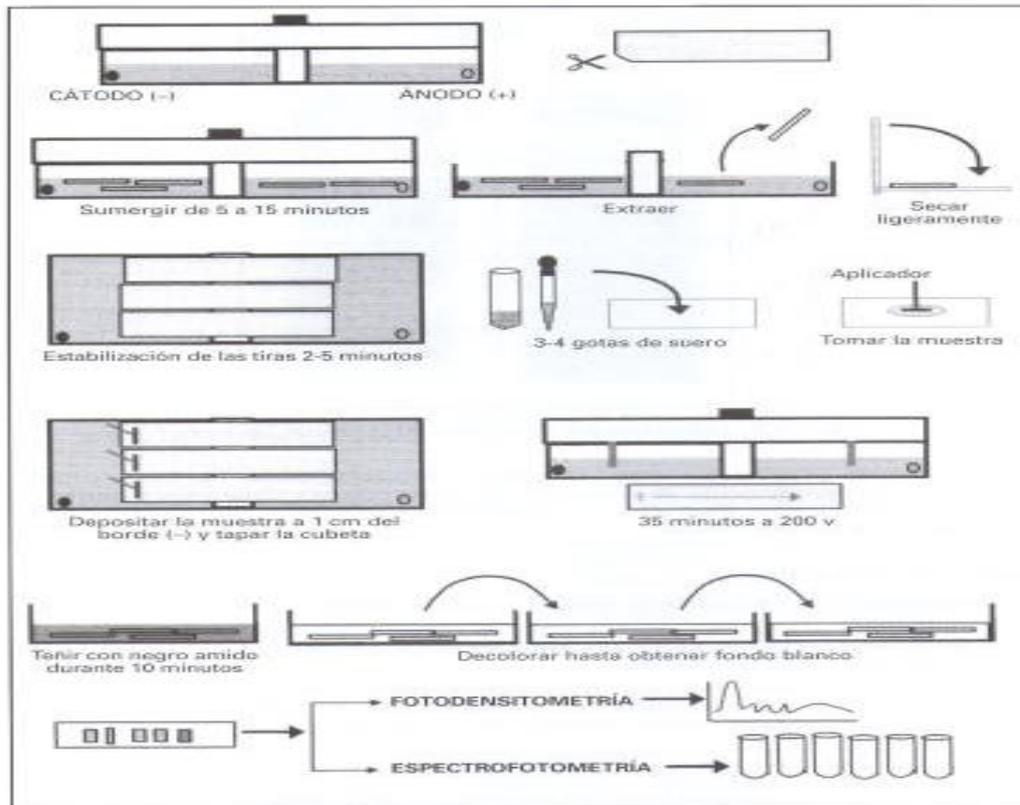
- a. Preparar la gradilla con seis tubos de ensayos cortos.
- b. Rotular en orden según fracciones (albumina, α 1, otras), y el sexto tubo como blanco.
- c. Cargar solución de ácido acético al 80 %, 2 ml al tubo de albumina y 1 ml a los restantes.
- d. Cortar las fracciones en los valles y colocar cada una en los respectivos tubos según corresponda. En el sexto tubo cortar una fracción de la tira de acetato de celulosa blanca de tamaño semejante a las fracciones α 1.
- e. Homogenizar correctamente, hasta disolución total.
- f. Leer a λ : 540 nm, llevando a cero con el blanco (Tubo N°6)
- g. Anotar los valores de absorbancia según cada tubo.
- h. Multiplicar el tubo N°1 (albumina) por dos (por tener doble cantidad de diluyente).
- i. **Cálculo:**
Informe Valores relativo (%): realizar la sumatoria de todas las DO, ese valor corresponde a 100% luego por regla de 3 simple se calculan los porcentajes de las distintas fracciones.
Informe Valores Absoluto (g/dl): utilizando el valor de Proteínas totales como 100%, y por regla de 3 simple se calculan los valores correspondientes a las distintas fracciones.
- j. Informar según protocolo *Ver Anexo

7.3 Cuantificación por Densitometría: (se debe proceder al **paso 8**, transparentizar)

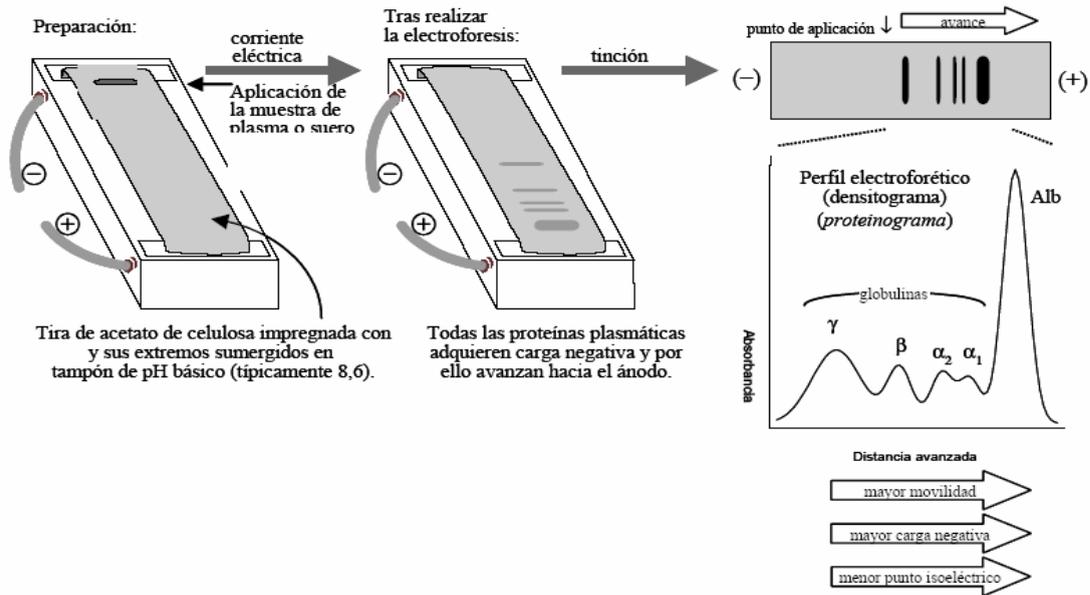
Se emplean fotómetros especiales que permiten cuantificar el colorante fijado a diferentes distancias del punto de aplicación de las proteínas.

Paso 8: Transparentizar, colocar la tira de acetato de celulosa en metanol (2 min), luego en mezcla de metanol y ácido acético (1 min) y luego colocar en un portaobjetos perfectamente limpio. Estirar bien y estufa a 37 °C hasta transparentización.

DIAGRAMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO DE EF



ANÁLISIS DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS POR ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA



Las fracciones proteicas que se observan al utilizar como **Soporte "tiras de acetato de celulosa"**, son:

Fracciones	Unidades
	%
Albúmina	52-65
Globulinas	
A1-globulina	2-5
A2- globulina	7-13
Beta-globulina	8-14
Gamma-globulina (IgG, IgA e IgM)	12-23

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

DIAGRAMA EN SOPORTE DE TIRAS ACETATO DE CELULOSA

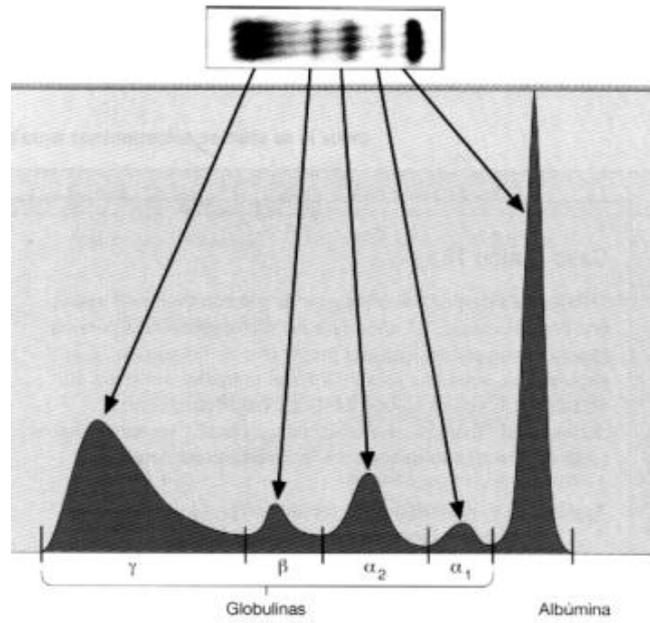
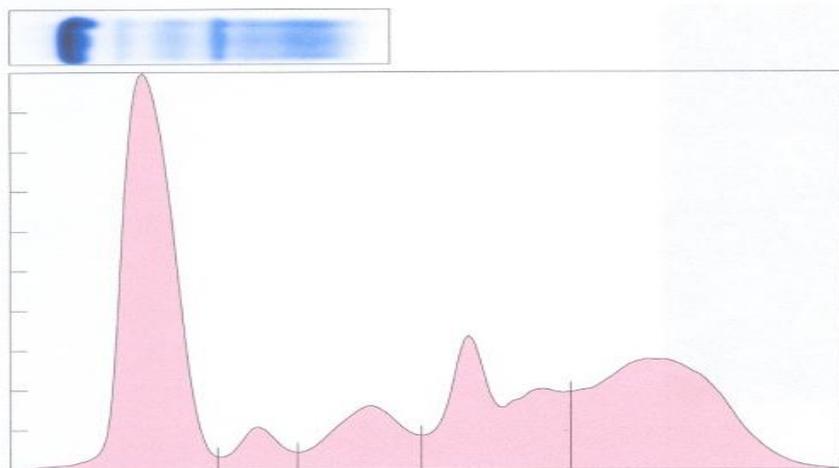
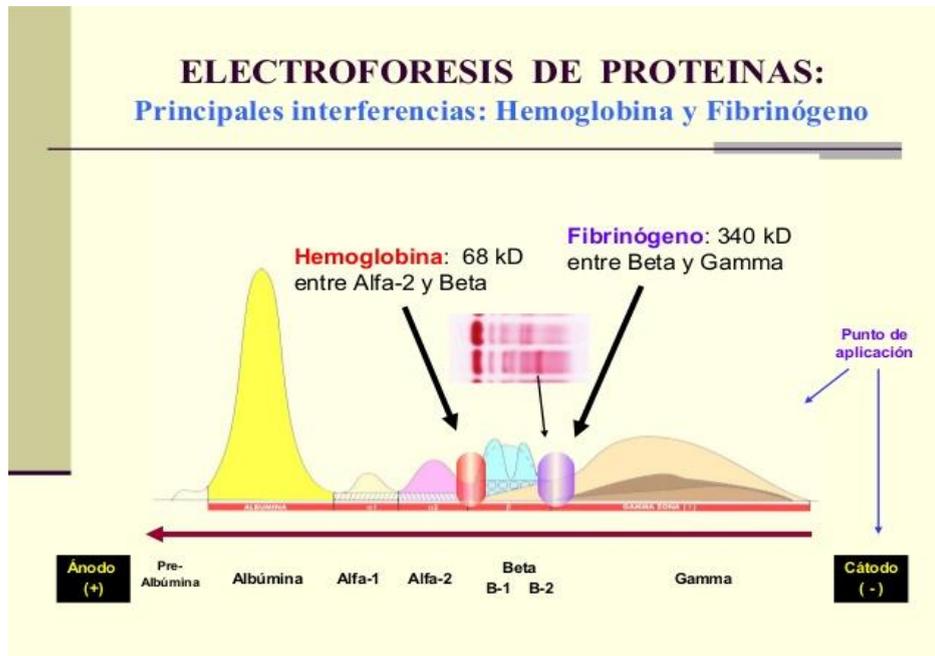


DIAGRAMA DE LA LECTURA DE UN DENSITOMETRO



Fraction	%	g/dL	g/dL Range
Albumina	39.9	2.9-	3.1 5.3
Alpha 1	3.6	0.3	0.2 0.6
Alpha 2	9.0	0.7	0.4 0.9
Beta	19.5	1.4+	0.5 1.1
Gamma	28.0	2.0+	0.7 1.6
Total Proteinas		7.3	6.0 8.0

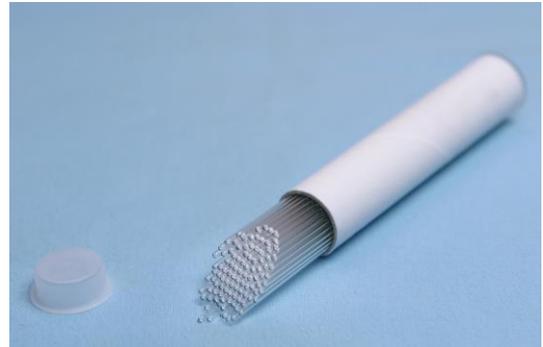
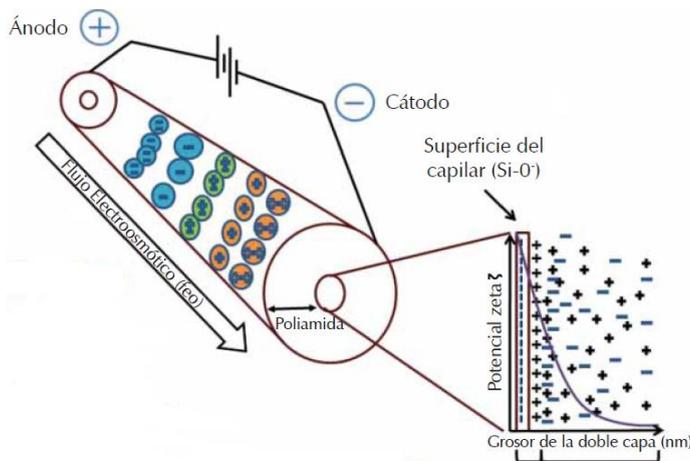


MÉTODO AUTOMATIZADO, ELECTROFORESIS CAPILAR

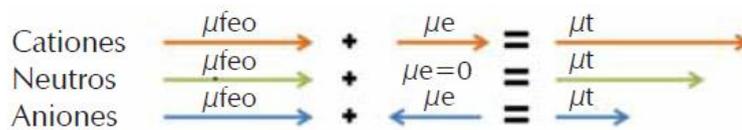
La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica que permite la separación y cuantificación de una amplia gama de analitos, entre ellos las proteínas.

Fundamento: La separación electroforética se efectúa en un capilar de diámetro inferior a 100µm, que contiene un buffer. Estos capilares están recubiertos de un polímero (poliamida) que les confiere alta flexibilidad facilitando su manipulación. Los grupos silanol (Si-OH) de la superficie del capilar a pH ≥ 3 son ionizados, por lo que la pared del capilar presentará carga negativa (Si-O⁻). En la pared del capilar se formará una primera capa (capa fija) de contra iones (cationes) que son atraídos por la carga negativa del capilar, seguida por una segunda (capa móvil), que se compone principalmente de cationes que están adyacentes a la capa fija y hacia el centro del capilar, el número de cationes y de aniones son equivalentes. Al aplicar un campo eléctrico, el exceso de cationes de la capa móvil establece un flujo neto de migración hacia el polo negativo (cátodo), generando un FLUJO ELECTROOSMÓTICO, que se refiere a la migración de un líquido (solución amortiguadora o buffer) respecto a una superficie cargada (pared del capilar) al aplicar un campo eléctrico. La movilidad del flujo electrosmótico (μ_{feo}) está en función de la

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

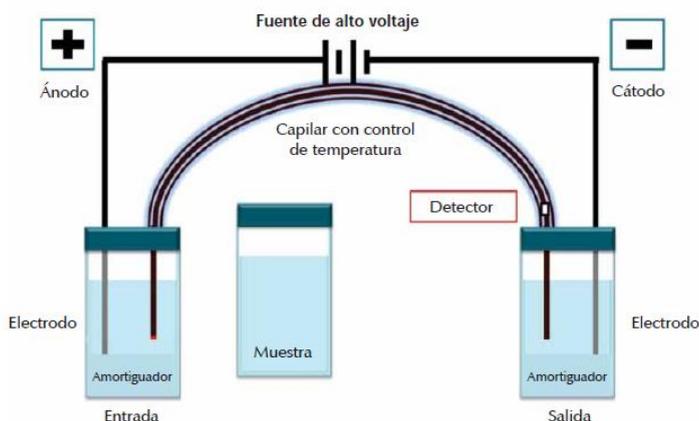


Principios de Separación: La migración de los analitos dentro de un campo eléctrico (movilidad electroforética μ_e) está determinado por la fuerza del campo eléctrico y la carga del analito por lo tanto la movilidad total (μ_t) de los analitos dentro del capilar es la suma vectorial de μ_{feo} y μ_e , por lo que en los procesos de separación de electroforesis capilar de zona, donde se involucra principalmente la relación carga/masa de los analitos, los cationes de la muestra adquieren mayor movilidad total seguidos por los analitos neutros, y los aniones serán los que presenten menor μ_t .



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

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





Las soluciones amortiguadoras (fosfatos, boratos, citratos etc.) se introducen dentro del capilar mediante presión. Cuando el capilar se encuentra lleno y acondicionado con la solución amortiguadora, se inyecta la muestra de forma hidrodinámica (aplicando presión) o electrocinética (aplicando un campo eléctrico). Posterior a la inyección de la muestra se realiza la migración y separación de los analitos dentro del capilar por la acción del campo eléctrico.

La detección se realiza directamente sobre el capilar, es decir que el mismo capilar actúa como celda de detección. El detector ultravioleta – visible es uno de los más empleados en la EC. La longitud de onda escogida es de 214 nm, o de 200 nm de acuerdo al equipo con el que se trabaja. En el mercado se cuenta con el ***Minicap Sebia Electrophoresis y Capillarys II Sebia Electrophoresis.***



Ventajas:

- Los capilares permiten la aplicación de altos campos eléctricos (100-500 V/cm) con una alta eficiencia para la disipación del calor, evitando los efectos adversos del calentamiento de Joule.
- Los capilares son anticonceptivos en sí mismos, por lo tanto, no es necesaria la utilización de un gel soporte como medio.

- La detección es directa por cuanto “no existe el paso correspondiente a la coloración y decoloración de las corridas”
- La separación es muy rápida, se realiza en menos de 5 minutos.
- Sensibilidad 10 veces mayor que la de la cromatografía líquida de alta performance.
- Requiere pequeños volúmenes de muestras.

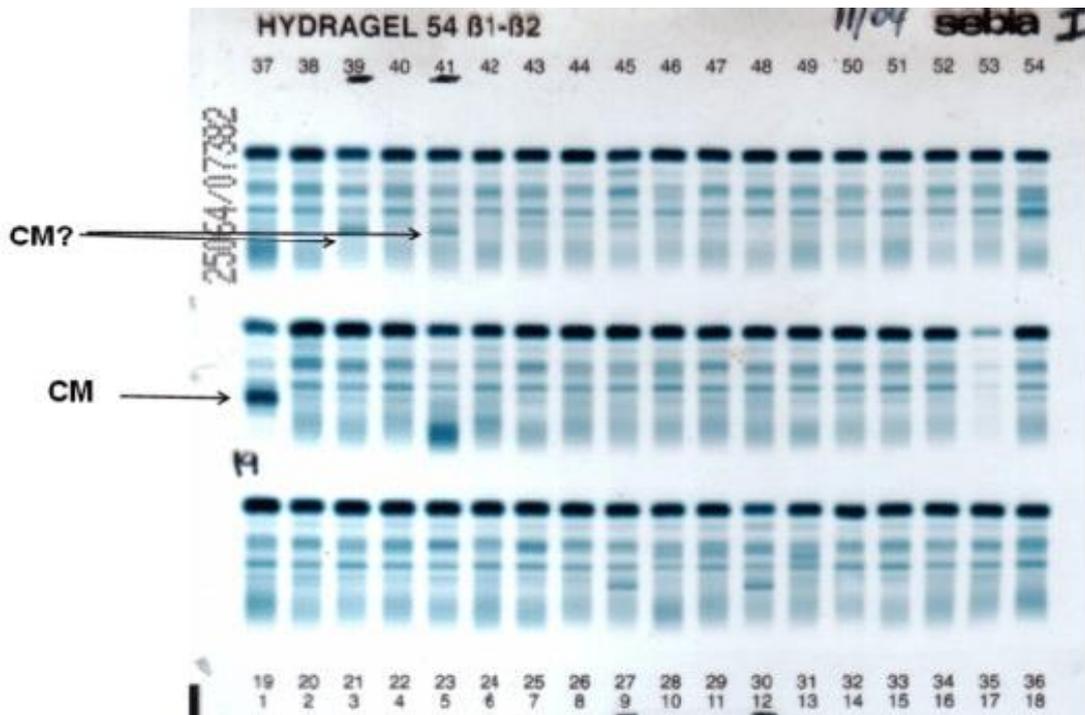
Desventajas:

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

EQUIPO SEBIA

Soporte: “gel de agarosa” (las β -globulinas, se dividen en: β -1 y β -2).

DIAGRAMA DE UNA ELECTROFORESIS AUTOMATIZADA. Sebía



Electroforesis Capilar:

- Tanto la velocidad de separación de los compuestos, como la resolución, mejoran a medida que aumenta la intensidad del campo eléctrico aplicado.
- Se realiza electroforesis en un tubo capilar de menos de 0.1 mm de diámetro y 50 a 100 cm. de longitud.
- Reduce el efecto Joule aumentando la disipación del calor generado.
- El mecanismo de separación se basa en la relación carga/masa
- Se utilizan volúmenes pequeños de 0,1 a 10 nL.

Electroforesis capilar en gel:

- Combina la técnica de electroforesis con la cromatografía de reparto.
- Separación en función de la migración electroforética y el peso molecular.
- Se lleva a cabo en la matriz polimérica de un gel poroso contenido en un tubo capilar

Electroforesis capilar de zona:

- Separación en función de la relación carga/tamaño.
- La composición del tampón es constante en toda la zona de separación.
- Los componentes de la mezcla migran cada uno según su propia movilidad y se separan en zonas que pueden estar completamente resueltas o parcialmente solapadas.
- No permite separar compuestos neutros.

INTERPRETACIÓN DEL PROTEINOGRAMA

Cuando se analizan la Proteinemia y las diversas fracciones del PTGR, las variaciones pueden ser por aumento de su concentración o por disminución.

Debe tenerse en cuenta que:

- **No existe** la hiperalbúminemia.
- **Todas** las hipoproteinemias, lo son por hipoalbuminemia.
- **Todas** las hiperproteinemias, lo son a expensas de hiperglobulinemias.

Proteinemia	Variación De Las Fracciones		Compatibles con los procesos
Hiperproteinemia	Albúmina baja y gran aumento de globulinas.	Aumento de β G:	Plasmocitoma y Macroglobulinemia.
		Aumento de γ G:	Plasmocitoma, Macroglobulinemia, Kala-Azar, Linfogranuloma, Cirrosis Esplenomegálicas y Endocarditis Lenta Abacteriana.
Variación ligera o nula de la Proteinemia	Albúmina baja y aumento de la α G y discreto de γ G		Inflamaciones, infecciones agudas y subagudas. Neoplasias.
	Albúmina baja, aumento dominante de γ G y a veces ligero de β G		Hepatitis, cirrosis hepática e infecciones crónicas.
	Albúmina baja y aumento discreto de α G, β G y γ G		Neoplasias.
Hipoproteinemia	Albúmina muy baja aumento de α 2G y β G y G normal o disminuida.		Nefrosis.
	Albúmina muy baja y aumentos nulos o discretos de α G, β G y γ G		Neoplasias digestivas, esteatorreas, enfermedades consuntivas y carenciales
	Albúmina muy baja y aumento de γ G		Cirrosis hepáticas de larga evolución, infecciones crónicas consuntivas.

Es importante tener presente los mecanismos responsables de dichas variaciones, tales como: *disminución de la síntesis (ej: hepatopatías, desnutrición); pérdida de proteínas por riñón (ej: nefropatía, fallo renal); aumento de síntesis (infecciones crónicas, gamapatía monoclonal); entre otras.*

Los patrones electroforéticos más frecuentes en la práctica clínica son:

1. *Modelo de malnutrición. Ej: desnutrición, malabsorción*
2. *Perdida de proteínas (tipo NO selectivo). Ej: enteropatía con pérdida de proteínas, quemaduras, hemorragias*
3. *Modelo nefrótico (pérdida de proteínas selectiva)*
4. *Enfermedad hepatodegenerativa*
5. *Modelo de cirrosis*

6. *Inflamación aguda*
7. *Inflamación crónica*
8. *Gammapatía policlonal*
9. *Hipogamaglobulinemia*
10. *Gammapatía monoclonal*

1. Modelo de malnutrición

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

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

2. Enteropatía con pérdida de proteínas

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

3. Modelo nefrótico

Hay pérdida selectiva de proteínas a nivel glomerular, en base a su peso molecular. En la proteinuria glomerular, se pierden las proteínas de bajo peso molecular (Alb, Tf, α_1 AT, gammaglobulinas IgG e IgA), mientras que las de alto peso molecular (α_2 -macroglobulina, β -lipoproteína e IgM) quedan retenidas en el suero. El uroproteinograma mostrará preponderancia de proteínas de bajo peso molecular.

En algunas instancias el modelo nefrótico es acompañado por la condición inflamatoria aguda o crónica, observándose un aumento de la fracción α_1 globulinas debido al aumento de reactantes de fase aguda.

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

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

4. Enfermedad hepatodegenerativa

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

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

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

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

5. Modelo de cirrosis hepática

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

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

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

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

6. Modelo inflamatorio agudo

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

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

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

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

7. Modelo inflamatorio crónico o de respuesta tardía

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

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

8. Gamapatía policlonal

Este patrón electroforético se debe al aumento heterogéneo de inmunoglobulinas.

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

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

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

9. Hipogammaglobulinemia

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

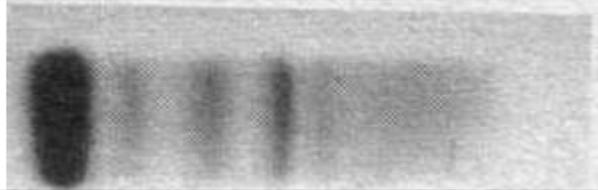
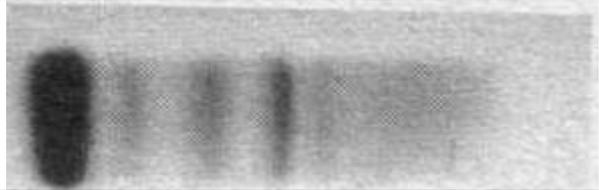
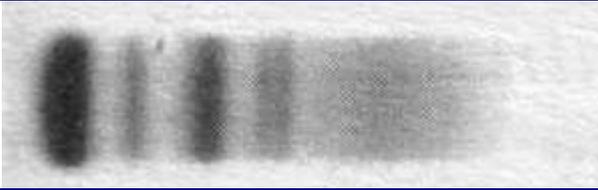
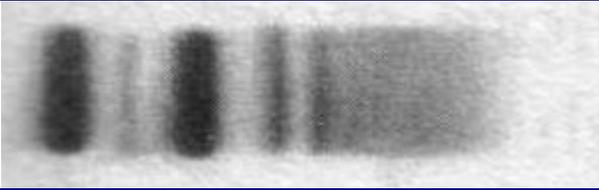
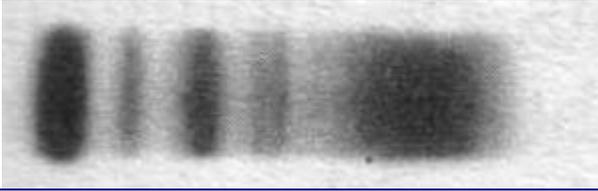
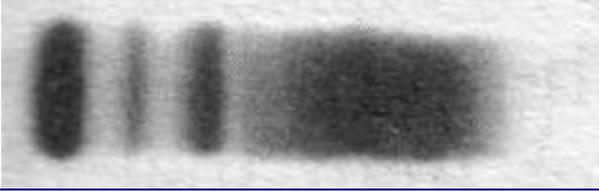
Ocurre normalmente en recién nacidos antes de la maduración de su sistema inmune. También ocurre en algunos estados de inmunodeficiencia congénita. En adultos más comúnmente se observa con alteraciones linforeticulares, donde las células plasmáticas fueron desplazadas por proliferaciones de linfocitos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

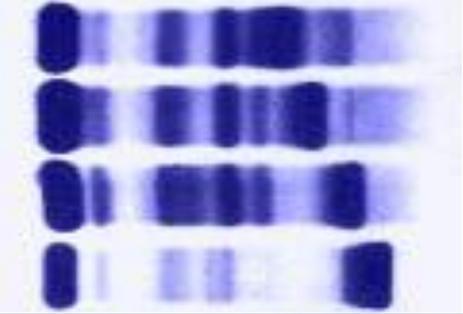
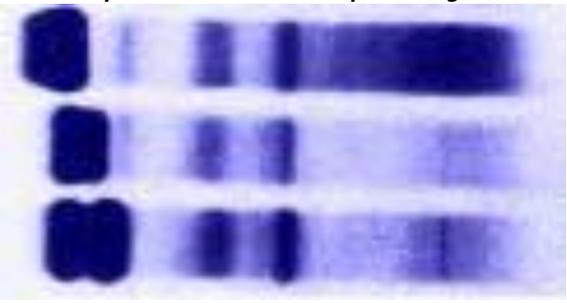
10. Gamapatía monoclonal

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

Se corresponde con una inmunoglobulina secretada como consecuencia de una proliferación monoclonal de células plasmáticas. Para identificar dicha banda debe hacerse *Inmunofijación* en suero y además un Uroproteinograma con una muestra de orina de 24 hs por la posible presencia de cadenas livianas eliminadas vía renal. *** Por lo general la fracción gamma policlonal normal está disminuida, debido a que las células plasmáticas normales son reemplazadas por un clon maligno; para cuantificar las Igs policlonales se puede realizar IDR o Turbidimetría.

PATRONES ELECTROFORETICOS	
Normal	Normal

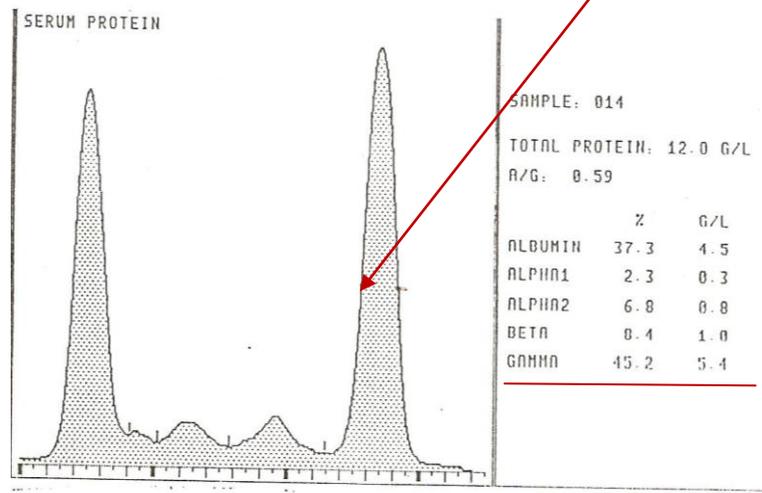
	
Reacción inflamatoria (fase aguda)	Síndrome Nefrótico
	
Reacción inflamatoria (crónica)	Cirrosis Hepática
	

Alteraciones de la fracción de γ globulinas	Principales alteraciones del Proteínograma(III): (Componentes M) *** En orden IgA, IgG, IgG e IgM
	
<p>Principales alteraciones del proteinograma:</p>  <p><i>Bisalbuminemia</i></p>	

*** Frente a un patrón Electroforético, COMPONENTE M (Monoclonal-Gammapatía monoclonal), debemos:

- **IDENTIFICAR** el **COMPONENTE M**, *en suero y orina*: con métodos de Inmunofijación o Inmunoelectroforesis. (manual o automatizado)
- **CUANTIFICAR** el **COMPONENTE M** (se determina su concentración de la cuantificación del PTGR) y las **Inmunoglobulinas policlonales** (por Turbidimetría, otros)

DIAGRAMA DE UN DENSITOMETRO, Muestra con COMPONENTE M



IV. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Los métodos desarrollados a continuación, permiten la Identificación de las proteínas:

- a. Inmunoelectroforesis (IEF)
- b. Inmunofijación

INMUNOELECTROFORESIS (IEF)

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

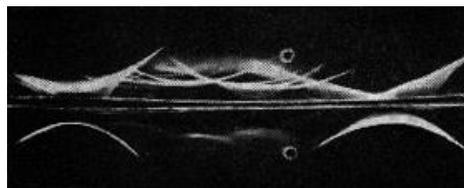
En un primer paso las proteínas se separan en un gel de agar de acuerdo a la densidad de cargas eléctricas por exposición a una diferencia de potencial.

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

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



NORMAL



COMPONENTE MONOCLONAL

INMUNOFIJACIÓN (IF)

La IF combina un fraccionamiento electroforético seguido de una reacción Ag-Ac in situ

Procedimiento:

Pasos 1 y 2 Seguir los mismos pasos del PTG.

Pasó 3: Siembra: Diluir el suero del paciente a una dilución tal que la concentración final del componente en estudio quede dentro de un rango 0.1 a 0.2 gr/dl.

Se realiza 1 siembra del suero puro del paciente y 5 siembras del suero diluido del paciente.

Paso 4: Una vez finalizada la corrida (200V, a 30min) se corta la tira con la corrida del suero puro y se colorea con Negro Amido 10B por 5min, y luego se decolora como un PTG.

La tira restante queda sobre el puente de la cuba y sobre cada calle de corrida se coloca un papel de filtro rectangular del tamaño del ancho de la siembra y el largo según posición del componente en estudio, embebido cada uno de los papeles con el antisuero correspondiente (el orden es anti- γ , anti- α , anti- μ , anti- κ y anti- λ) se tapa la cuba y se incuba en cámara húmeda durante 15 min., luego se retira los papeles de filtro y se la lava la tira de acetato con solución fisiológica durante un mínimo de 2 hs.

Paso 5: Se procede a colorear la tira con el colorante Azul Brillante de Coomasie durante 10 min.

Paso 6: Decoloración: Colocar la tira en solución decolorante, con homogenización constante. Realizar este procedimiento de manera de ir cambiando la solución decolorante, a fin de obtener una tira libre de colorante, quedando únicamente las fracciones donde las proteínas estén coloreadas mediante el fenómeno de fijación del colorante a las proteínas.

Observación: cada solución decolorante, deber ser reciclada y deben colocarse números, de manera que, los frascos van del 1 al 6 y la intensidad de la coloración deber ir disminuyendo (en degradé, de coloración fuerte a nula)

Paso 7: Interpretación de los resultados

Materiales:

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



ANTISUEROS



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

SP: suero puro del paciente

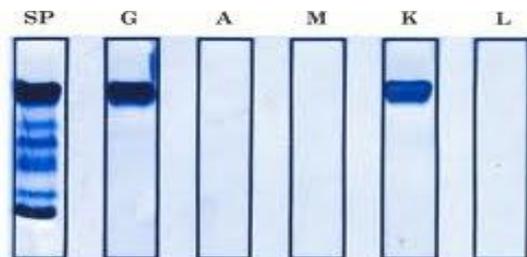
SP γ α μ κ λ



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

SP: suero puro del paciente

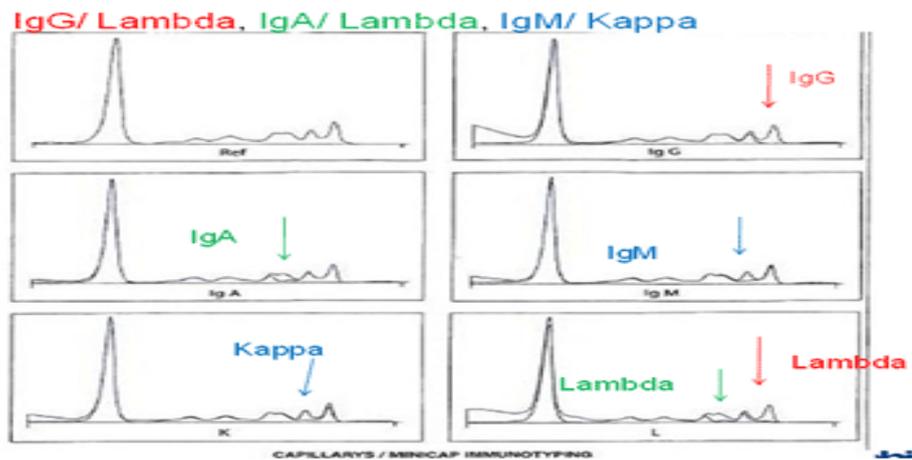
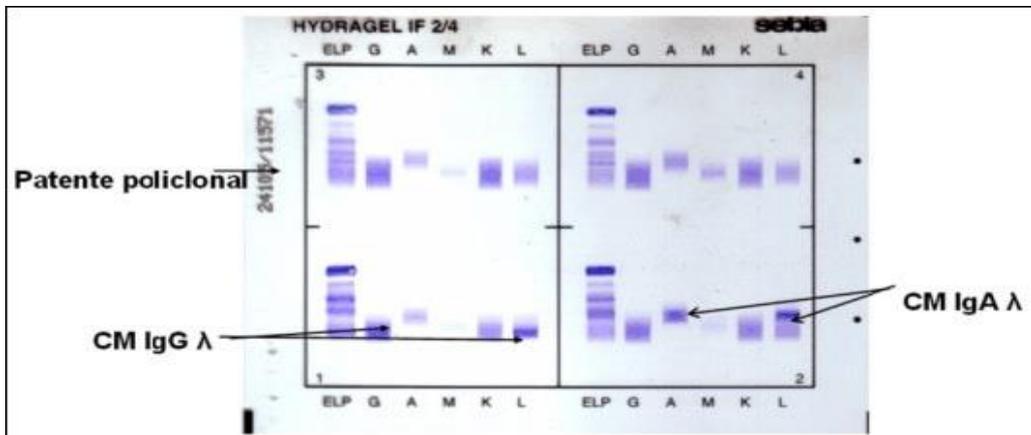
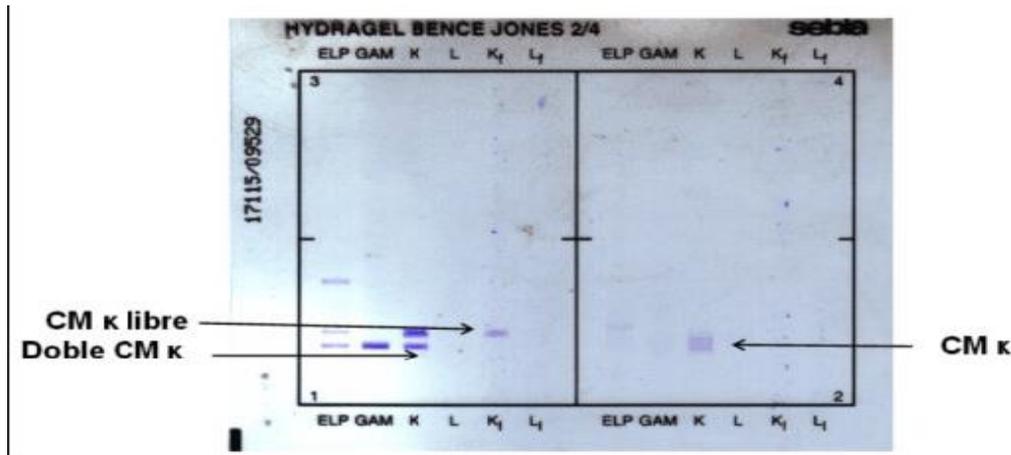
SP γ α μ κ λ



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

Fig N° 3: Inmunoelectroforesis de proteínas

INMUNOFIJACION - METODO AUTOMATIZADO SEBIA



V. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

- A. Inmunodifusión radial (IDR)
- B. Turbidimetría
- C. Nefelometría

D. Dosaje De Cadenas Ligeras Libres (Freelite - Inmunodiagnóstico)

A. Inmunodifusión Radial (IDR)

Se incorpora la solución de Ac al agar fundido y se deposita sobre placas de Petri o sobre portaobjetos de vidrio. Una vez solidificado se realizan pequeños pocillos en los que se introduce la solución de Ag a investigar. Las moléculas del Ag difunden desde el pocillo en todas direcciones rápidamente a través del agar. Tras un período de incubación definido, se observará un círculo de precipitación alrededor del pocillo donde fue sembrado el Ag.

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

Procedimiento y cálculo de la concentración

1. Preparar agar impregnado con Ac

2. Agregar estándares y muestras

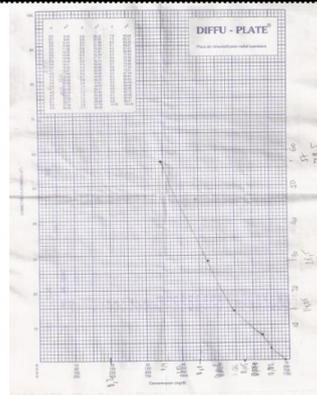
3. Colocar en cámara húmeda y permitir la difusión

4. Visualizar los anillos de precipitación. Medir diámetro

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

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

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



Placa comercial de IDR

Usos: Esta técnica se utiliza habitualmente para dosificar por ejemplo inmunoglobulinas (IgG, IgM o IgA) o la fracción C3 del complemento en el suero del paciente.

B. Turbidimetría / C.Nefelometría

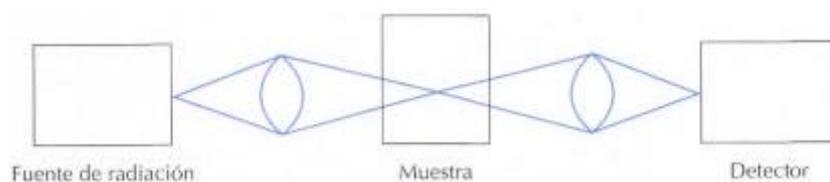
Cuando un haz de luz choca con una partícula en suspensión parte de la luz se dispersa, parte de la luz se refleja y parte de la luz se absorbe.

La dispersión de la luz depende de: la longitud de onda de la luz, del tamaño de la partícula y del índice de refracción de la partícula en relación con el medio que la rodea.

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

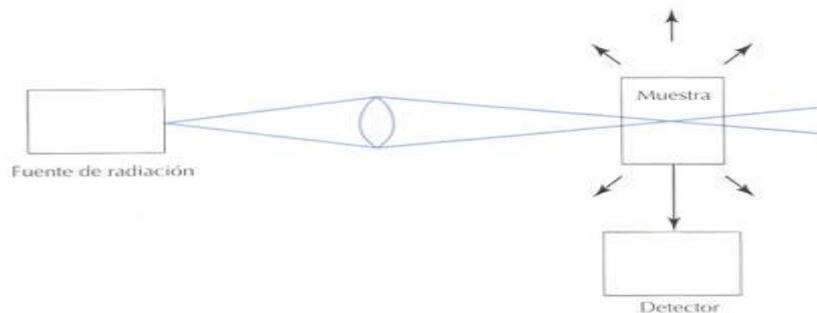
En ambas técnicas, para dar como resultado una concentración de proteína concreta, se compara la cantidad de luz dispersada o la tasa de aumento de dispersión con los valores de dichos parámetros en estándares proteicos conocidos.

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



La Nefelometría: mide la luz dispersada en dirección distinta a la luz emitida (generalmente con ángulos que oscilan entre 15 y 90°).

Utiliza como instrumento el nefelómetro (en el que el detector se ubica con un ángulo que oscila entre 15 y 90° ej. a 90°). Se suele utilizar para concentraciones más diluidas.



Aspectos Prácticos:

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

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

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

Cuando se ponen en contacto un Ag y un Ac específico contra ese antígeno, ambos reaccionan y forman un complejo Ag-Ac. Inicialmente los complejos se forman rápidamente, pero, existe una segunda fase de crecimiento de complejos más lenta y, es precisamente en esta fase en la que aparece la dispersión de la luz. Así, en la inmunturbidimetría e inmunonefelometría se mide la dispersión de la luz provocada por

los complejos Ag-Ac. En ocasiones los Ac se unen a bolitas de látex para aumentar el tamaño de los complejos (inmunoanálisis potenciados).

D. Dosaje De Cadenas Ligeras Libres (Freelite - Inmunodiagnóstico)

Las cadenas ligeras libres (CLL) son cadenas livianas de Igs que no se han unido a las cadenas pesadas y que circulan libremente por la sangre. Esta prueba mide la cantidad de CLL de tipo kappa y lambda en sangre, y permite establecer un cociente (ratio) kappa/lambda que proporciona información complementaria en el diagnóstico y seguimiento de las discrasias de células plasmáticas, entre las que se incluyen el mieloma múltiple (MM) y la amiloidosis primaria. También se emplea para monitorizar la eficacia del tratamiento, de manera que una disminución de su concentración y la normalización progresiva del cociente kappa/lambda indican respuesta al tratamiento.

Normalmente, se produce un exceso de cadenas ligeras libres, por lo que éstas pueden ser detectadas en personas sanas donde el cociente kappa/lambda está comprendido entre 0.26 y 1.65.

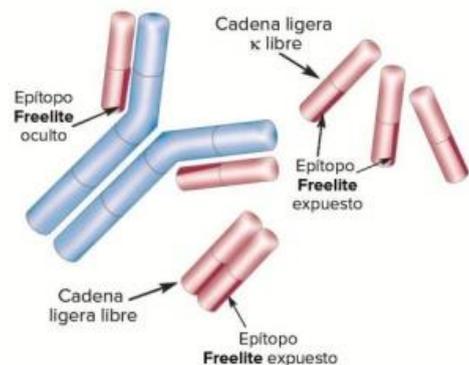
En enfermedades renales no asociadas a discrasias de células plasmáticas pueden observarse aumentos de la concentración de las cadenas ligeras libres, a pesar de que el cociente kappa/lambda sea normal. Contrariamente, en trastornos que afectan a la médula ósea inhibiéndola, se pueden observar disminuciones de la concentración de cadenas ligeras libres con un cociente kappa/lambda normal

Muestra: Suero

Metodología:

Fundamento Freelite es un marcador específico y sensible de CLL κ (kappa) y λ (lambda). Los anticuerpos policlonales purificados por afinidad, reaccionan específicamente con formas libres de la cadena ligera κ y λ , y están recubiertos con partículas de látex. La medición se realiza por nefelometría y Turbidimetría.

Freelite presenta mayor sensibilidad que la electroforesis en orina y evita la obtención de falsos negativos en pacientes con alteraciones de la función renal.



ANEXO

Preparación de reactivos para Electroforesis Convencional - Proteinograma

Buffer: hay muchas fórmulas, uno de los más utilizados es el veronal sódico al 0.04M,

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

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

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

Líquido decolorante

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

Solución transparentizadora:

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

Solución de Elución

- Ác. Acético al 80%

Valores de referencia:

	RN	NIÑOS	ADULTOS	
	g/dl	g/dl	g/dl	%
Proteínas totales	4,6 - 7,4	6,4 - 8,1	6 - 8	
Albúmina	2,5 - 3,4	3,9 - 5,0	3,2 - 5,2	52 - 65

A1-globulina	0,1 – 0,3	0,2 – 0,3	0,1 - 0,3	2 - 5
A2- globulina	0,3 – 0,5	0,4 – 1,0	0,4 – 1,0	7 – 13
Beta-globulina	0,2 – 0,6	0,5 – 1,1	0,5 – 1,1	8 - 14
Gamma-globulina	0,2 – 1,0	0,7 – 1,2	0,8 – 1,8	12 - 13

MODELO DE PROTOCOLO DE INFORME

LABORATORIO

NOMBRE:

ORDEN N°:

DNI:

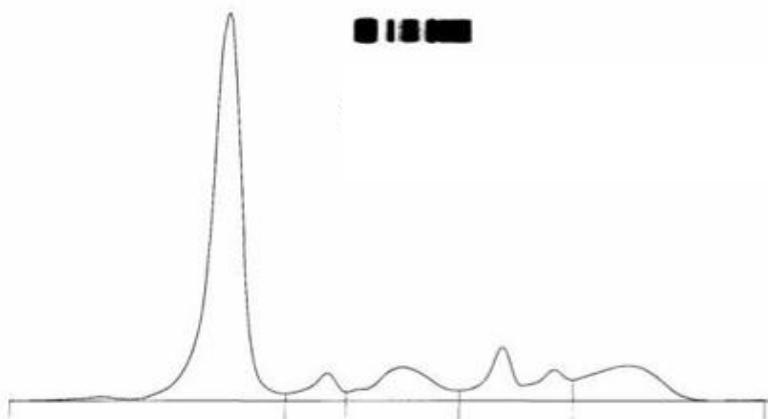
FECHA DE NACIMIENTO:

MEDICO SOLICITANTE:

MUESTRA BIOLÓGICA:

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

PROTEINOGRAMA ELECTROFORÉTICO



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

Comentarios

Firma y sello
Matricula del Profesional Bioquímico

BIBLIOGRAFIA

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

LABORATORIO DEL METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

Cátedra de Bioquímica Clínica II
Carrera de Bioquímica
FCEQyN - UNaM

INTRODUCCIÓN

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

LABORATORIO

La DM puede diagnosticarse con cualquiera de las siguientes pruebas:

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

1. Glucemia en Ayunas

La *Glucemia en Ayunas* representa la concentración de la glucosa en sangre en condiciones basales.

Instrucciones para el paciente para la toma de muestra

1. No modificar las actividades y la alimentación cotidiana.
2. El día anterior a la prueba cenar de manera habitual a una hora determinada, para lograr un ayuno de 8 horas.
3. Solamente podrá beber agua, sin ingerir ningún tipo de alimento y/o infusión después de la cena.
4. El día del turno, concurrir entre las 7 y las 9 horas directamente al laboratorio en ayunas
5. No realizar ninguna actividad física (Ej: ir al banco y/o compras)

Nota: las Instrucciones deben ser explicadas en forma verbal y entregadas de manera escrita, redactadas en lenguaje claro y sencillo.

2. Glucemia al Azar

La *Glucemia al Azar* representa la concentración de la glucosa en sangre en cualquier momento del día (fuera del estado basal).

Esta prueba se realiza con mayor frecuencia en situaciones de *Urgencias Médicas*, por lo que el paciente no cumple con ningún requisito.

Al momento de Interpretar los resultados tener en cuenta: la hora de la toma de muestra y horario de la última ingesta.

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

Es una prueba dinámica que consiste en monitorear la metabolización de la glucosa frente a una sobrecarga de solución glucosada en condiciones estandarizadas. Es más sensible y específica que la *Glucemia en Ayunas* para el diagnóstico de DM y diagnosticar *Estado Hiperglucémico “Tolerancia Alterada en Ayunas” (TGA)*

Dentro de las pruebas dinámicas que evalúa la metabolización de la glucosa frente a la sobrecarga de solución glucosada, se tiene *Curva de Tolerancia a la glucosa (CTG)* y *Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG)*, cuyas **diferencia** es que, en la primera se realizan determinaciones seriadas de *Glucemia* a los tiempos 0 (en ayunas) a los 30, 60, 90 y 120 minutos; y en la PTOG las determinaciones de *Glucemia* se realizan en dos tiempos: 0 (ayunas) y 120 minutos post carga de una solución glucosada; siendo esta última **prueba PTOG**, la de uso frecuente en la práctica clínica; si bien no es recomendada en la rutina clínica por su variabilidad individual.

Frente a una solicitud de **PTOG**, se deberá en primer lugar indagar sobre los antecedentes personales, familiares y los valores de *Glucemia en Ayunas*, si estos fueran inferiores a 125 mg/dl, se podrá realizar la prueba.

La **PTOG** no se debe practicar en pacientes con situaciones clínicas inflamatorias y/o infecciosas, como por ejemplo por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que estén recibiendo inhibidores de proteasas, por el alto número de resultados de *Glucemia* falsamente elevados.

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

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

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

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

- El tiempo que permanecerá en el laboratorio durante la prueba será de aproximadamente 3 h.
- Permanecerá sentado y no podrá fumar o ingerir alimentos durante el desarrollo de la prueba.
- La prueba debe iniciarse las 07 y las 09 h am.
- Al ingresar al laboratorio, descansara unos 15 minutos, y se le realizara la extracción sanguínea basal.
- En caso de que el valor de *Glucemia de la primera extracción* sea ≥ 126 mg/dl no se realizará la prueba.
- Luego tomara una solución de glucosa en 5 minutos aproximadamente.
- A las dos horas del inicio de la ingesta, se le realizará la segunda extracción (120 min).
- En caso de nauseas o vómitos durante la prueba, la misma se suspenderá

Nota: La solución glucosada debe prepararse al 20 % disuelta en 375 ml de agua; en adultos y embarazados se utilizará 75grs de glucosa anhidra, en pediátricos con peso corporal menor a 30 kg se utilizará 1,75grs/kg

CONSIDERACIONES EN LAS DIFERENTES ETAPAS

ETAPA PRE ANALÍTICA

Las condiciones del paciente varían según las Pruebas diagnósticas vistas en párrafos anteriores, las que deben ser cumplidas en Glucemia en ayunas y PTOG, y en Glucemia al Azar tener presente las condiciones del paciente al momento de la extracción sanguínea.

El **tipo de muestra biológica** generalmente es obtenida por venopunción (Ver guía de Toma de muestra Bioquímica Clínica I):

1. Pruebas: Glucemia en Ayunas, Glucemia al Azar, PTOG; en cada una de estas pruebas se realiza la determinación de glucemia.

Muestras biológicas: plasma y/o suero

*Nota: La muestra de elección es **plasma obtenida con EDTA-fluoruro** como anticoagulante, debido a su acción antiglucofítica. Pero en la práctica diaria, la muestra que se utiliza es **SUERO**; en esta muestra para minimizar el consumo de la glucosa por las células, se recomienda que el suero o plasma se separen de las mismas, o realizar la determinación dentro de las 2 horas de la extracción.*

Tener presente que la tasa de glucólisis, varía en 5 -7 % promedio, aproximadamente 10 mg/dl/h de concentración de glucosa, siendo responsable la temperatura, el recuento de leucocitos, eritrocitos y tiempo de exposición a estos factores.

*En caso de utilizar **Tubos primarios con geles**, tener en cuenta que posterior al proceso de centrifugación, el gel mantiene separado al suero del paquete celular, por lo que no es prioridad en este caso la separación del suero del paquete celular*

2. Prueba: Hemoglobina Glicosilada

Muestra biológica: sangre entera (EDTA)

Será desarrollado más adelante en la presente guía.

ETAPA ANALÍTICA

1. Pruebas: Glucemia en Ayunas, Glucemia al Azar, PTOG; en cada una de estas pruebas se realiza la determinación de glucemia.

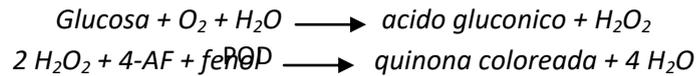
Las metodologías analíticas más utilizadas para la determinación de **GLUCEMIA** son: *de Punto Final Colorimétrico Enzimático (glucosa oxidasa) y Cinética Enzimática (hexoquinasa).*

Los procedimientos pueden ser manuales o automatizados dependiendo de la capacidad operativa del laboratorio.

Método de punto final colorimétrico enzimático: Glucosa Oxidasa

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

GOD



Método cinético enzimático: Hexoquinasa

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

2. Prueba: Hemoglobina Glicosilada

Se describirá más adelante, en la presente guía.

ETAPA POST ANALÍTICA

Una vez concluida la determinación de *Glucemia*, se deben interpretar los resultados teniendo en cuenta *los valores de referencia (V.R) de Glucemia*, es importante conocer que los mismos varían según la edad del paciente. Pero es relevante tener presentes que fueron establecidos como V.R, según diferentes estudios multicéntricos y aceptados por las distintas Asociaciones Internacionales,

Valores de Referencia

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

Tabla 1. Valores de Referencia según Grupo Etario.²

En ayunas	Intervalo (mg/dl)	Intervalo (mmol/l)
Cordón umbilical	45 a 96	2,50 a 5,33
Prematuros	20 a 60	1,11 a 3,33
Recién nacidos	30 a 60	1,67 a 3,33
Recién nacidos, 1 día	40 a 60	2,22 a 3,33
Recién nacidos, > 1 día	50 a 80	2,78 a 4,44
Niños	60 a 100	3,33 a 5,55
Adultos	70 a 105	3,89 a 5,83
> 60 años	80 a 115	4,44 a 6,38
> 70 años	83 a 110	4,61 a 6,10

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

² Ref: Laboratorios ABBOTT - Hexoquinasa

Teniendo en cuenta los V.R de *Glucemia*, podemos estar frente a las tres *interpretaciones bioquímicas*:

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

Por tanto, en función a los resultados de *Glucemia* en cada una de las *Pruebas Diagnósticas* se podrán arribar a definir los **Estados Hiperglucémicos**:

- **Diabetes ***
 - **Glucemia en Ayunas Alterada (GAA) ****
 - **Tolerancia Alterada a la Glucosa (TAG/IGO)****
- } Prediabetes

Ref: * Ver Criterios de DM Tabla 2; ** Ver criterios en Fig1

Las asociaciones internacionales ADA, ALAD, OMS y la SAD, establecen el **Diagnóstico de DM** en un paciente, si se cumplen algunos de los tres **Criterios diagnóstico de DM**. *Tabla 2*

Tabla 2. **Criterios Diagnóstico de DM**

1. Dos Glucemias en Ayunas con valores \geq a 126mg/dl (7 mmol/L, realizadas en 2 días distintos con diferencia entre 5-7 días
2. Síntomas de DM (poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso) más Glucemia al Azar \geq a 200 mg/dL (11 mmol/L).
3. Glucemia a los 120 minutos \geq a 200 mg/dl , después de una sobrecarga de solución glucosada (al 20% ,75 gr en 375 ml de agua) (PTOG)
4. Valores de Hemoglobina Glicosilada (HbA1c) \geq6.5 % (*) En 2 ocasiones, la cual no es necesaria si el paciente manifiesta síntomas y existen niveles de glucemia

Tabla 3. Diagnóstico de Pre-diabetes, por HbA1c

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

Nota:

(*) En 2008 el Comité Internacional de Expertos en Diabetes recomienda el uso de HbA1c, gracias a los avances en la instrumentación, estandarización y precisión en la medición de la misma HbA1c concuerda con las glucemias y las complicaciones clínicas. En nuestro país son muy pocos los laboratorios que se encuentran en estas condiciones, por lo que en la práctica diaria se sigue utilizando como prueba de control del tratamiento de los pacientes con diagnóstico de DM.

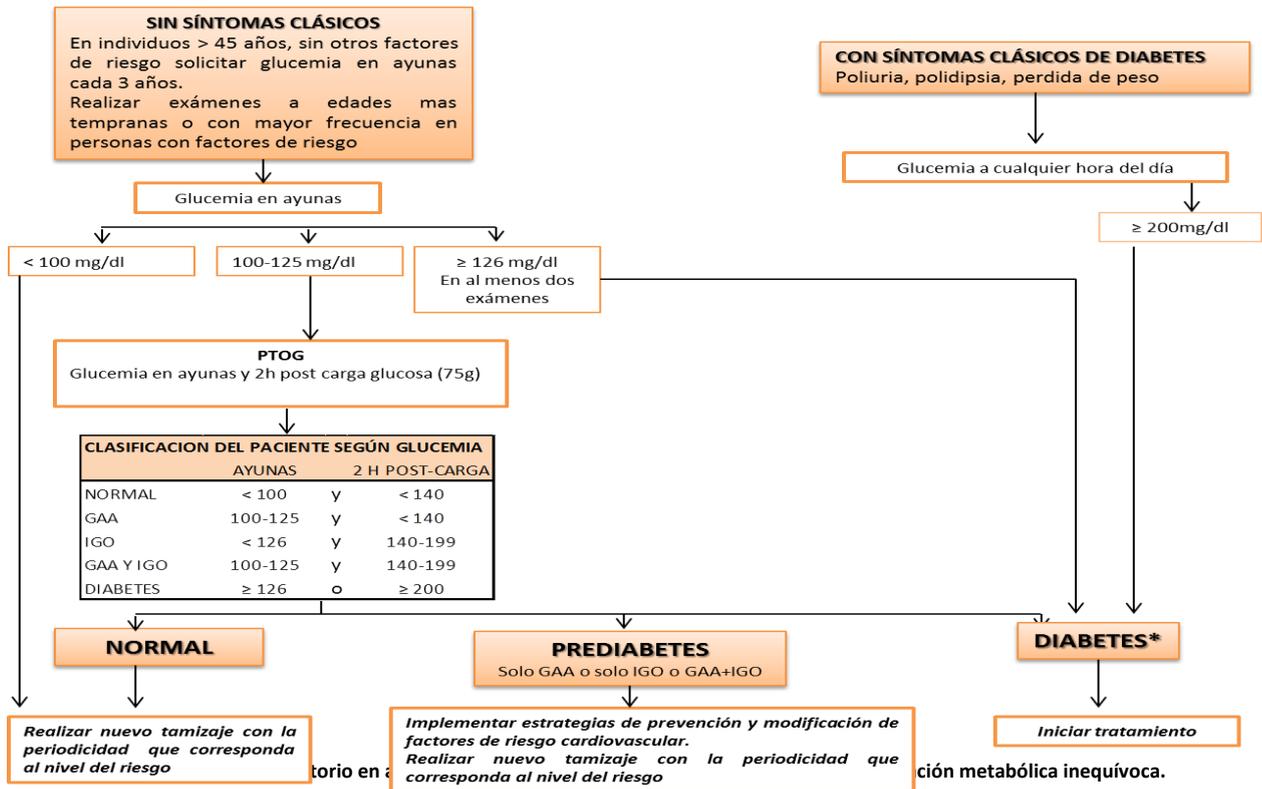
Recientemente un comité de expertos en DM, constituido por la ADA, ALAD, IDF y EASD, recomiendan el uso HbA1c como nueva herramienta diagnóstica de DM y del Estado Prediabético.

Se sugiere aplicar los otros métodos diagnósticos para el estado Prediabético y/o DM en aquellos casos en que la hemoglobina glicosilada presente alguna limitación para su utilización (gestantes, niños, hemoglobinopatías, pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC), VIH u otras enfermedades que pueden presentar alteraciones en la vida media de los eritrocitos).

La PTOG se recomienda realizar en todas las personas presenten factores de riesgo y/o Glucemia en Ayuna Alterada (GAA).

Para realizar el diagnóstico de DM solamente se pueden utilizar los métodos de laboratorio para medir la glucemia, y **NO** los Glucometer (Métodos rápidos-Punción capilar)

Fig 1. Algoritmo diagnóstico de DM



Las *Pruebas Diagnósticas* deben considerarse en todos los adultos con sobrepeso ($IMC \geq 25Kg/M^2$ o $\geq 23Kg/M^2$ si hablamos de la población asiática) y tengan alguno de los siguientes factores de Riesgo:

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

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

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

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

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

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

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

EL LABORATORIO EN EL CONTROL Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON DIABETES

El control de la DM tiene como objetivo eliminar los síntomas, evitar las complicaciones agudas y disminuir la incidencia y progresión de las complicaciones crónicas microvasculares y macrovasculares al combinarlo con el control de otros factores de riesgo asociados como la Hipertensión arterial y la dislipemia.

Para lograr un buen control de la DM se deben alcanzar metas establecidas para cada uno de los *parámetros bioquímicos* que se evalúan:

Pruebas de Laboratorio en el Control de pacientes Diabéticos:

1. **Control del Metabolismo de los HC:** Glucemia, HbA1c, Fructosamina
2. **Perfil lipídico:** Colesterol total; HDL-colesterol; LDL-colesterol; Triglicéridos; Lipidograma.
3. **Perfil de función renal:** Uremia, Creatininemia, Proteinuria, Albuminuria.

Y no menos importante el control de la presión arterial y las medidas antropométricas relacionadas con la obesidad, que contribuyen a establecer el riesgo de desarrollar complicaciones crónicas

1. CONTROL DEL METABOLISMO DE LOS HC

SEGÚN LAS RECOMENDACIONES DE LA ADA DEL AÑO 2014, HAY DOS SITUACIONES PARA EL CONTROL DEL METABOLISMO DE LOS HC:

- a) **AUTOMONITOREO**
- b) **MONITOREO POR EL LABORATORIO**

a) AUTOMONITOREO:

Se realiza en sangre capilar utilizando tiras reactivas y un glucómetro para su lectura es el método ideal. Su resultado se suele identificar como “glucometría” para diferenciarlos de la glucemia medida en el laboratorio. Se recomienda hacer glucometrías a diferentes horas (pre y/o postprandiales, otras) con su registro diario (indicando valor, horario y situación particular si la hubiese), según criterio médico; ya que permite conocer el comportamiento de la glucemia a lo largo del día. Pero es fundamental la educación y entrenamiento del paciente en el auto monitoreo por glucometría.

b) Monitoreo por el Laboratorio:

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

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

En cada prueba, se realiza el dosaje de Glucemia con las mismas consideraciones de: Tipo de muestra Metodologías. La diferencia son los horarios de las extracciones sanguíneas, indicados por el médico, lo que debe ser expresado en el informe del resultado.

Las recomendaciones de **buen Control Metabólico de los HC** para la mayoría de los adultos con DM son:

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

b.2 Hemoglobina glicosilada (HbA1c)

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

Su uso en el monitoreo del control del metabolismo de la glucosa, en pacientes diabéticos, nos permite obtener una valoración aproximada de los niveles de la glucemia en los últimos 2-3 meses debido al tiempo de vida media del eritrocito y a la exposición de la hemoglobina intraeritrocitaria a los niveles de hiperglicemia.

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

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

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

Tabla 3. Correlación entre Concentración de HbA1c y la glucemia media.
Estudio Internacional A1C-Derived Average Glucose (ADAG). Aceptada por ADA 2014

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

El uso de test rápidos de HbA1c en consulta nos permite modificar los tratamientos de forma inmediata.

HEMOGLOBINA GLICOSILADA

ETAPA PRE ANALÍTICA

Condiciones del paciente:

- Solicitud programada, se respetará las condiciones basales y ayuno de 8hs.
- Solicitud en el marco de una *Situación de Urgencia* (*), las condiciones a las cuales se encuentra el paciente.

La determinación de la concentración de la HbA1c, no está influenciada por las interferencias del ayuno o variaciones circadiana.

(*) es una prueba que, según estudios recientes, sería un buen marcador en pacientes con hiperglucemia en los Servicios de Urgencia para avalar el DM

Muestra: Sangre entera con EDTA

Conservación y estabilidad de la muestra: ver inserto del reactivo.

ETAPA ANALITICA

MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA

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

Unidades de Medida: Siguiendo las recomendaciones internacionales, los resultados de HbA1c deben ser informados de manera simultánea en unidades IFCC (mmol/mol) y en unidades NGSP (%) derivadas, utilizando la llamada ecuación maestra IFCC -NGSP.

Las unidades IFCC (mmol/mol) se expresan sin decimales y las NGSP (%) con un decimal.

Valores de Referencia del NGSP: 4 – 5.6 %

Para calcular el equivalente en unidades IFCC (mmol/mol) partiendo de unidades NGSP/DCCT (%).

$$\text{IFCC (mmol/mol)} = (\text{NGSP \%} - 2,15 / 0,915) \times 10$$

Metodologías y Fundamentos de dosaje de HbA 1c:

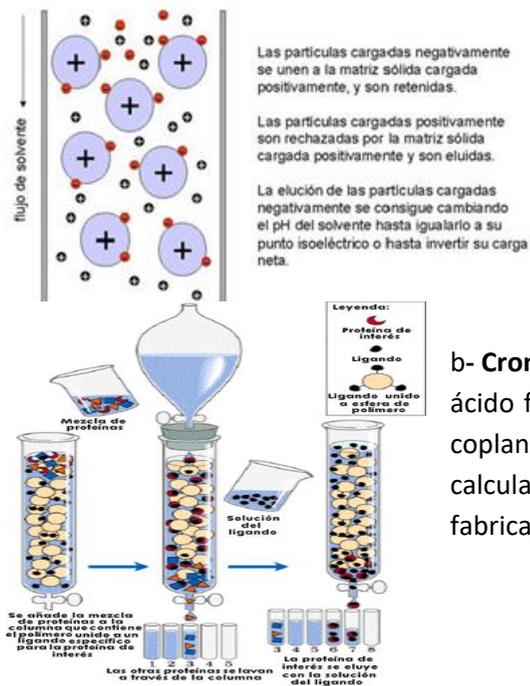
1. **Inmunoturbidimétricos:** Se refiere a métodos basados en reacciones inmunológicas, que al igual que la nefelometría posee una gran similitud técnica con la espectrofotometría de absorción molecular. Consisten en la valoración de la disminución de la potencia radiante, de una emisión policromática, al atravesar una solución de partículas (inmunocomplejos), medida en la misma dirección en que es emitida (es decir, el emisor y el detector están a 0º). Dicha disminución es debida a procesos de absorción, dispersión y reflexión. Los métodos Inmunoturbidimétricos son reconocidos internacionalmente como equivalentes al método HPLC, según el NGSP.
2. **Electroforesis:** Se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.
3. **Isoelectroenfoque:** Consiste en la separación de los componentes de la hemoglobina en un gradiente de pH superficial formada dentro de un gel de poliacrilamida. Después de la separación de las

bandas se corta el gel y se eluye las bandas en el buffer de un día para otro la mezcla en un rodillo. Las concentraciones de hemoglobina son entonces medidas por su absorción a 415 nm.

La principal ventaja de este método es su especificidad. Una de las principales ventajas sobre el isoelectroenfoco es su velocidad: una separación adecuada se puede lograr mientras el paciente está todavía en la clínica.

4. **Cromatografía:** Técnica de separación de sustancias que se basa en las diferentes velocidades con que se mueve cada una de ellas a través de un medio poroso arrastradas por un disolvente en movimiento.

PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IÓNICO



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

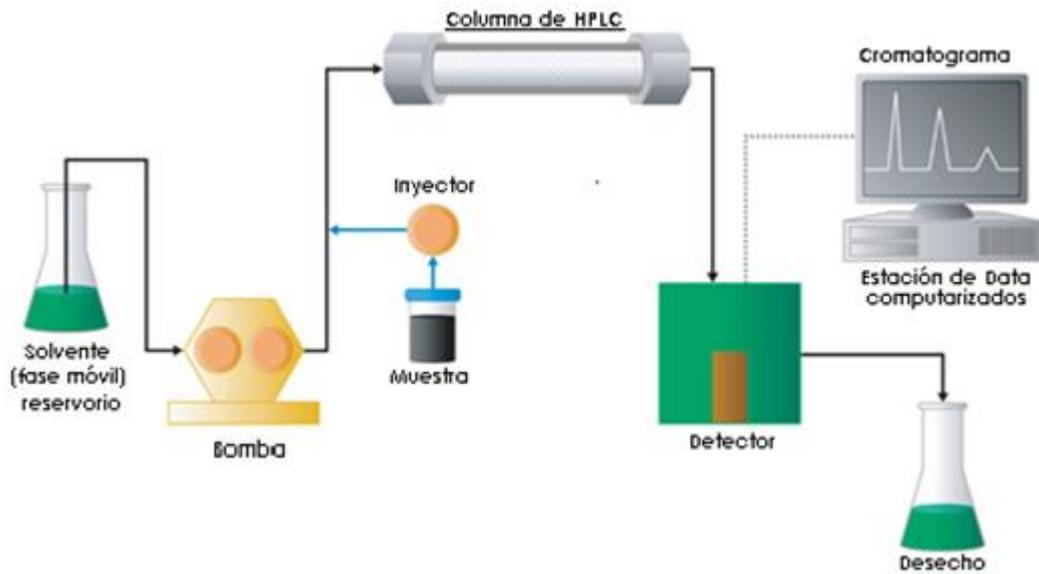
b- Cromatografía de afinidad: método se basa en la capacidad del ácido fenilborónico en solución alcalina de unirse con grupos cis-diol coplanares. Usualmente miden hemoglobina glicosilada total y se calcula la fracción A1c basado en una correlación realizada por el fabricante.

5. High performance liquid chromatography (HPLC)

Es llamada Cromatografía Líquida de Alta eficacia o Cromatografía Líquida de Alta Presión. Utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

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

ende la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil.



Ventajas y desventajas del dosaje de la HbA1c

Ventajas

- No requiere ayuno.
- Refleja la glucemia de los periodos de 3-4 meses previos.
- No se afecta por enfermedades agudas.
- Menor variabilidad biológica intraindividual que la glucosa
- Se usa como parámetro para el diagnóstico y para el control del metabolismo de los HC

Desventajas

- Posibilidad de valor erróneo por hemoglobinopatías, anemia o Insuficiencia Renal.
- Mayores diferencias entre laboratorios que con la glucemia basal.
- Mayor Costo.
- Antirretrovirales: disminuyen 1% el valor de la HbA1c.
- Etnia: africanos y caribeños tienen 0,4% más que los europeos.

Interpretación Bioquímica de HbA1c:

Al considerar a la HbA 1c, como parámetro de diagnóstico, teniendo en cuenta los valores de referencia de la HbA1c y los criterios de diagnóstico de las diferentes Asociaciones Internacionales y Nacional, se define las siguientes situaciones en un paciente:

INTERPRETACIÓN	Valor de HbA 1C	Unidades
Normal	4 -5,6	%
Pre-diabetes	5,7-6,4	%
Diabetes	≥ 6,5	%

Y en cuanto a los objetivos de control metabólico de los HC por HbA1c:

Las recomendaciones **de buen Control Metabólico Glucémico** para la mayoría de los adultos con DM son:

Parámetros	Valor Standardizado	Unidades
HbA1c	< 7	%

FRUCTOSAMINA:

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

La FMN permanece en sangre actuando como memoria glicémica hasta ser metabolizada, por lo tanto, su concentración representa en forma retrospectiva una medida de la media de las fluctuaciones de la glucemia 15 días previos a la realización del análisis.

Refleja el control glucémico de las 2-3 semanas anteriores y no está bien establecida su correlación con las complicaciones crónicas.

Es un método alternativo cuando no se dispone de la HbA1c.

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

La FMN ha sido considerada como una prueba alternativa a la HbA1c en aquellos casos en los cuales esta no es fiable por ejemplo para evaluar cambios rápidos del tratamiento de la *Diabetes Gestacional (DG)* (esencial durante el embarazo ya que las necesidades de la madre cambian de manera constante durante la gestación: disminución de la vida media de los hematíes, como anemia hemolítica o pérdida de sangre, presencia de variantes de hemoglobina, como en la anemia falciforme)

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

ETAPA PRE ANALÍTICA

Condiciones del paciente:

Solicitud programada, se respetará las condiciones basales y ayuno de 8hs.

Muestra: Suero o plasma obtenido con Anticoagulante EDTA o Heparina

Conservación y estabilidad de la muestra: ver inserto del reactivo.

ETAPA ANALITICA

Metodología: Método colorimétrico - cinético.

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

Valores de Referencia: Hasta 285 nmoles/l

Y en cuanto a los objetivos de control metabólico de HC por FMN:

Las recomendaciones de **buen Control Metabólico Glucémico** para la mayoría de los adultos con DM son:

Parámetros	Valor Standardizado	Unidades
FMN	< 300	nmol/l

2. PERFIL LIPÍDICO: Colesterol total; HDL-colesterol; LDL-colesterol; Triglicéridos; Lipidograma.

Los controles son establecidos por el profesional médico, según el Protocolo de seguimiento en los diferentes tipos de Diabetes. (Estudio se los lípidos serán vistos en la Unidad de Estudio de Lipoproteínas.)

3. PERFIL DE FUNCIÓN RENAL: Uremia, Creatininemia, Proteinuria, Albuminuria.

El protocolo de estudio, es definido por el profesional médico, según los diferentes tipos de DM, permite definir: Nefropatía Incipiente, Insuficiencia Renal establecida o ausencia de daño renal. (Dosaje de Uremia y Creatininemia, serán vistos en la unidad de Proteínas),

Parámetros de estudios en orina:

- Proteinuria de 24 hs
- Albuminuria (Microalbuminuria)

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

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

Ejemplo general de Protocolo del estudio.

1. Se inicia el estudio con la PROTEINURIA.

Dos opciones:

- Valor obtenido mayor al Límite superior de referencia (en dos oportunidades diferentes, con 21 días de diferencias) *DIAGNOSTICO DE FALLO RENAL ESTABLECIDO.*
- Valor obtenido menor al Límite inferior de referencia:

Realizar: **ALBUMINURIA** (microalbuminuria), se obtiene dos resultados posibles:

- Resultado de Albuminuria < al Límite inferior del V.R: *Diagnóstico Ausencia de daño Renal*
- Resultado de Albuminuria > al Límite superior del V.R, repetir a los 21 días, y si obtiene otro resultado de Albuminuria > al Límite superior del V.R: *Diagnóstico Nefropatía Incipiente*

DETECCIÓN Y CONTROL DE DIABETES MELLITUS PRE GESTACIONAL (DPG) Y GESTACIONAL (DG)

Tradicionalmente, la DG ha sido definida como una alteración en la tolerancia a los hidratos de carbono de severidad variable, que comienza o es diagnosticada por primera vez en el embarazo en curso.

Esta definición, si bien ha sido ampliamente utilizada a nivel internacional desde hace varias décadas, es al menos incompleta.

De tal manera, ha sido necesario definir a la **DPG** como:

“aquella situación en la que una mujer con DM tipo 1 o 2 que se embaraza o una embarazada que cumple con los criterios diagnósticos de Diabetes según la OMS durante el 1º Trimestre”

- Glucemia al Azar ≥ 200 mg/dl, más síntomas
- Glucemia en ayunas 126 mg/dl en dos oportunidades diferentes con lapso de 7 días.
- Glucemia plasmática ≥ 200 luego de la sobrecarga con glucosa 75 gramos (p75)

La prueba para detección de la DG, *Glucemia en Ayunas*, debe realizarse en la primera visita prenatal de todas las embarazadas con y sin factores de riesgo.

La búsqueda de DG debe hacerse en todas las embarazadas, independientemente de la presencia o no de los siguientes **factores de riesgo**:

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

Crterios Diagnósticos DG

Se diagnostica DG cuando la embarazada presenta:

- a) Dos o más glucemias en ayunas ≥ 100 mg/dl (5.5 mmol/L) o ≤ 126 mg/dl en transcurso de la semana, asegurando un ayuno de 8 horas.

b) Glucemia ≥ 140 mg/dl a los 120 min post carga de solución glucosada (PTOG)

Algoritmo de Estudio y Diagnóstico, ver la figura 2

Figura 2. Algoritmo diagnóstico en DG*

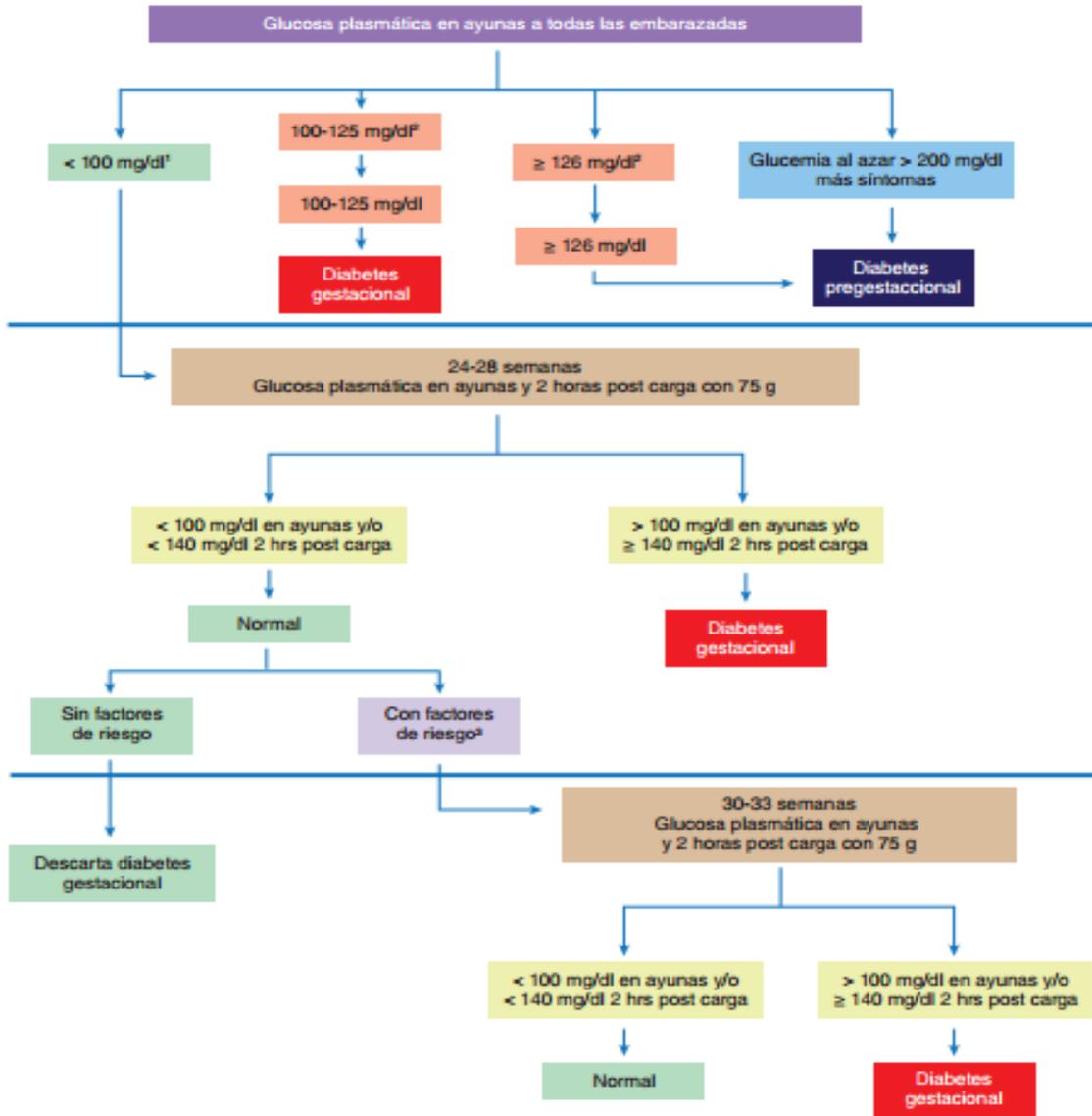


Figura N°2: Algoritmo diagnóstico de DMG

Notas:

Repetir la *Glucemia en Ayunas* en un plazo máximo de siete días.

Con respecto a la PTOG se entiende, y se debe verificar, que la dieta de una embarazada incluye buena cantidad de H de C por lo tanto si cumple con el resto de los requisitos puede realizarse al día siguiente de la solicitud médica.

Re testear entre las 31 y 33 semanas a todas las embarazadas con factores de riesgo, priorizando a las embarazadas que presenten factores de riesgo aparecidos o desarrollados durante el embarazo. (ALAD 2016)

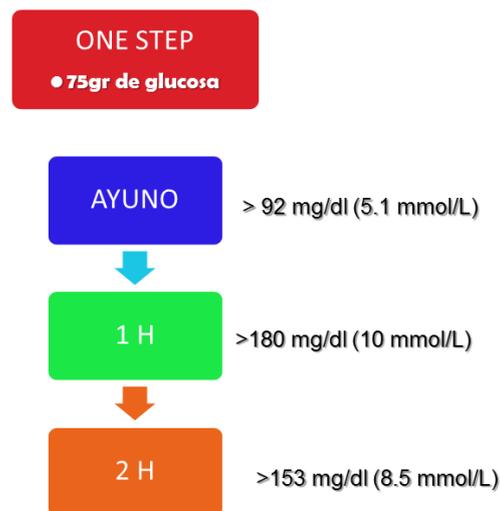
El diagnóstico de DG es uno de los aspectos en los que aún persiste discrepancia entre los criterios de la OMS, la ADA y diversos grupos de expertos.

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

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

Estrategias de diagnóstico:

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

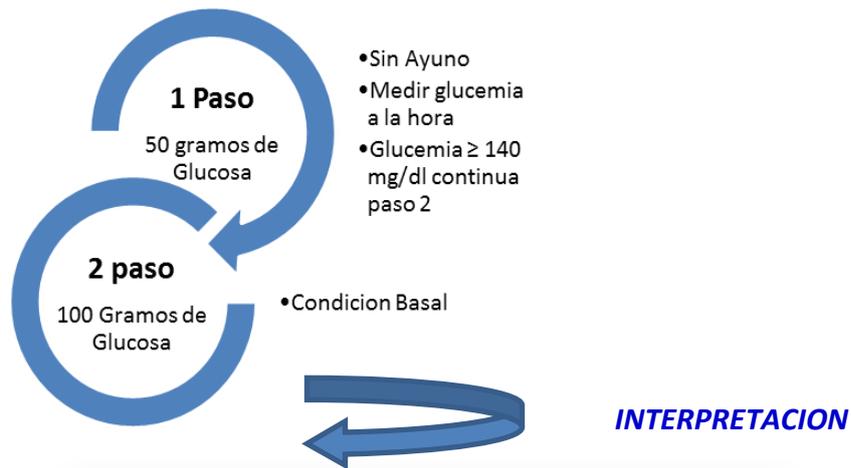


La OMS en cambio difiere en el criterio diagnóstico ya que utiliza únicamente el valor basal y el de los 120 minutos, con un punto de corte de 140 mg/dl:

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

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

El diagnóstico de DMG se hace si los valores de glucemia son \geq en al menos dos de las siguientes cuatro posibilidades.



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

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

- I. Sobrecarga con 75 g de glucosa, y determinación de glucemia a las dos horas (PTOG) **DG** si su valor es \geq 140 mg/dl a las 2 hs. (Recomendado por la OMS y por NICE)
- II. Sobrecarga con 75 g de glucosa y determinación de glucemia basal, 1ª y 2ª hora **DG** si al menos uno de los valores es \geq a lo normal.

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

Reclasificación y Monitoreo ulterior

A todas las pacientes con diagnóstico de DG, deberá monitorearse su metabolismo con Glucemia *en Ayunas*, y en aquellas con valores normales durante el puerperio se recomienda *realizar una PTOG* según la metodología de la OMS **a los 45 días (6 semanas post parto)**

. Ver algoritmo de reclasificación Fig.5

Los resultados de esta prueba nos permitirán determinar las siguientes posibilidades diagnósticas:

- DM: Glucemia a 2 h post carga es ≥ 200 mg/dl
- TAG: Glucemia 2 h post carga entre 140 y 199 mg/dl
- **Paciente Normal: Glucemia 2 h post carga es <140 mg/dl.****

**** Aquellas pacientes que, en la reclasificación a los 45 días posparto, tengan valores de glucemia a las 2 hs < 140 mg/dl, son las que han padecido de DG.**

Las mujeres con antecedentes de DG deben ser controladas durante toda la vida para detectar el desarrollo de DM o prediabetes al menos cada 3 años.

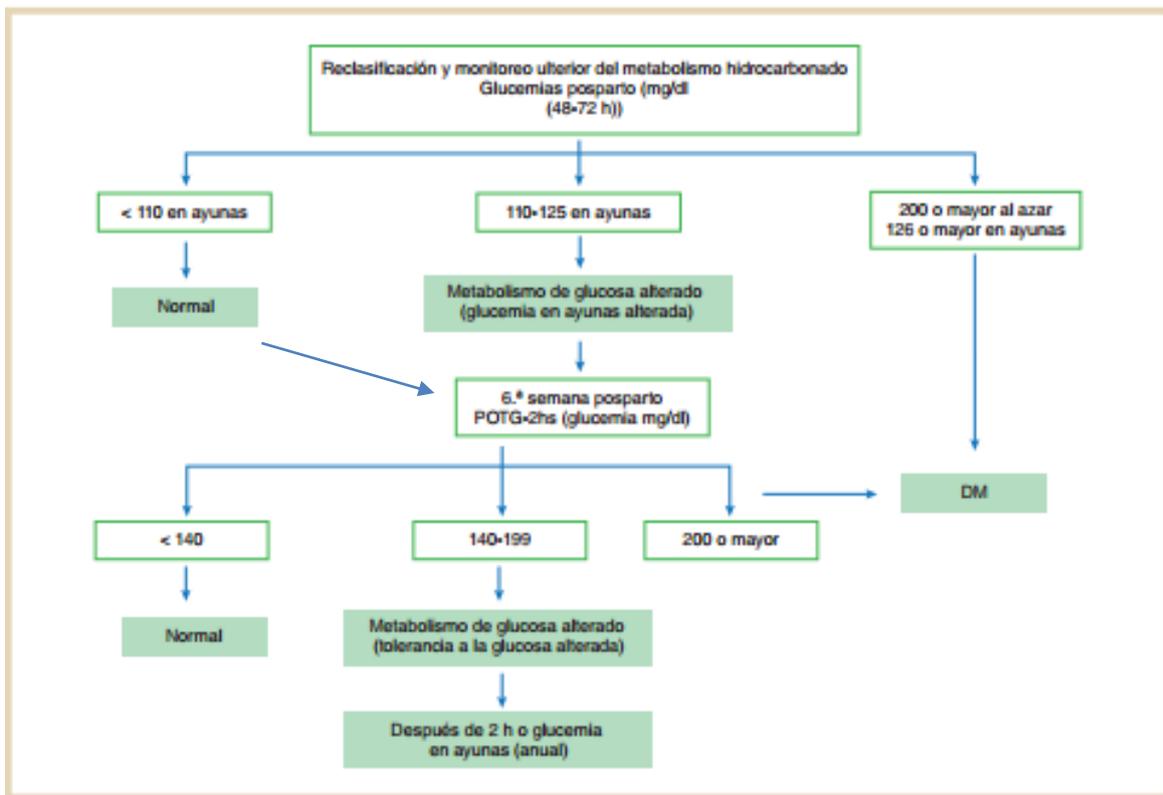


Figura N: 5 Algoritmo de Reclasificación y monitoreo ulterior del metabolismo Hidrocarbonado (Adaptado de las guías NICE, 2015).

PRUEBAS DE DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

Una vez diagnosticada la DM, es importante clasificar adecuadamente a cada, ya que las implicaciones clínicas son relevantes, tanto pronósticas (predisposición al desarrollo de complicaciones crónicas u otras enfermedades asociadas) y terapéuticas, como relacionadas con el riesgo de desarrollar la enfermedad para los familiares directos del paciente.

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

PARÁMETROS DE LABORATORIO:

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

ANTICUERPOS (ACS)

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

ANTICUERPOS ANTI GAD (GADA)

La enzima descarboxilasa de ácido glutámico sintetiza el neurotransmisor inhibitorio GABA (ácido gamma-aminobutírico) a partir del ácido glutámico.

Tiene 2 isoformas GAD 65 presente en SNC y páncreas y GAD 67 en SNC

Metodología: estos anticuerpos se pueden dosar por RBA (ensayo de unión por radioligando) que consiste en medir los inmunocomplejos radioactivos formados tras incubar una muestra con Insulina recombinante humana marcada con Iodo125, obteniéndose la fuente de GAD a partir de la transcripción y traducción in vitro de lisados celulares como reticulocitos, que funcionan como una maquina sintetizadora de polipéptidos, a los cuales se les agrega un vector o un gen codificante activo para la GAD 65 humana, polimerasa y aminoácidos para síntesis proteica. Los resultados se obtienen con un suero patrón de referencia y las unidades de expresión se informan como INR (índice numérico relativo) GAD INDEX.

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

Valor de referencia: Negativo

Otras metodologías:

-RIA: radio inmunoanálisis. *Valor de Referencia:* 0-1 U /ml.

-A través de biotecnología se está desarrollando la metodología de ELISA para GAD.

Utilidad:

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

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

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

ANTICUERPOS ANTI- ISLOTE (ICA)

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

Metodología:

Su detección se lleva a cabo por Inmunofijación Indirecta (IFI) a través de cortes de páncreas humanos frescos de grupo sanguíneo "0". Es una metodología con muchas limitaciones prácticas. Las unidades son UJDF (Unidades de las Juvenile Diabetes Foundation).

Valor de referencia: cualitativo: negativo o positivo

Cuantitativo: menor a 10 UJDF

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

Utilidad: Los ICA son marcadores precoces de DMT1 y preceden en años a la aparición de los síntomas clínicos y luego de instalada la enfermedad desaparecen paulatinamente. Se presentan en el 70-80% de los casos de diabetes de novo y prediabetes. Solo estaría indicada su realización en casos de prediabetes con negatividad de los otros anticuerpos, y para diagnóstico diferencial entre LADA y DMT2.

ANTICUERPOS ANTI-INSULINA (IAA O IA)

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

Metodología: La metodología de referencia es RBA. La expresión final de los resultados se expresa en unión porcentual de la radioactividad, ligado específicamente por los anticuerpos. Se puede aumentar la sensibilidad de este método de screening utilizándose otra determinación como la binding capacity (BC). Se recomienda informar no solamente los títulos sino también las subclases de Inmunoglobulinas IgG y el epítipo de Insulina involucrados.

Utilidad: Este marcador se correlaciona inversamente con la edad, por lo tanto, muestran mayor prevalencia entre los pacientes que debutan a edades más tempranas, entre 5 a 10 años. Se han detectado IAA en aproximadamente un 40 a 50 % al debut de pacientes con DM T1. Usualmente, estos

autoanticuerpos están presentes en la persona con LADA. Por lo tanto, se puede utilizar para el diagnóstico diferencial entre la LADA y la DMT2. Su estudio es útil en la falta de respuesta terapéutica al tratamiento con insulina. La detección de ambos marcadores (ICA e IAA) predice la insulinopenia con el subsiguiente desarrollo de DMT1 de manera más confiable que cada uno por separado.

ANTICUERPOS CONTRA EL ANTÍGENO ASOCIADO AL INSULINOMA (ANTITIROFINAFOSFATASA, IA2 O IA-2A) Y SU FRAGMENTO RELACIONADO (ICA512)

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

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

Otra metodología utilizada es RIA.

Valores de referencia:

RBA: Negativo: < 1

Positivo: > 1

RIA: < 10 U /ml.

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

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

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

ANTICUERPOS ANTI ZN-T8

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

Utilidad:

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

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

antígeno específico de célula beta por lo que la detección de ZnT8 pone en evidencia un daño de dichas células. Se usan como marcador adicional a GADA y IA2.

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

GADA+IA-2A+anti Zn T8: sensibilidad del 98 %

En resumen:

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

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

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

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

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

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

La búsqueda de los Acs puede utilizarse en:

- Diagnóstico Diferencial entre DMT1 y DMT2
- DMT2 y LADA.
- Diagnóstico precoz de Familiares de 1er grado de diabéticos insulino dependientes: Considerando que las manifestaciones clínicas aparecen en etapas avanzadas de la enfermedad cuando ya existe una destrucción de más del 90 % de las células β .

INSULINA

Muestra: suero

Metodología: ELISA, CLIA y RIA.

Valores de referencia:

- EIA: 42-188 pmol/L 6-27 μ U/mL
- RIA: 70-174 pmol/L 10-25 μ U/mL
- Quimioluminiscencia 2-15 uUI/ml

Utilidad e Interpretación clínica: en la mayoría de los casos el Diagnóstico diferencial entre DMT1 y DMT2 no se fundamenta en el dosaje de insulinemia, sino que se realiza teniendo en cuenta la presentación clínica, epidemiología y evolución de la enfermedad. La determinación de su concentración plasmática es útil en el diagnóstico de la neoplasia de las células β de los islotes pancreáticos (insulinoma) y en la evaluación de la resistencia insulínica en algunos pacientes con síndrome del ovario poliquístico, síndrome metabólico y trastornos relacionados con la hipófisis o las glándulas

suprarrenales. Así como también es relevante su dosaje en pacientes que presentan hipoglucemias. Su concentración puede estar aumentada también en embarazo, fiebre, ingestión de etanol, obesidad, edad avanzada, tabaquismo.

PÉPTIDOC

Muestra:suero

Metodología:EIA

Valores de referencia:

- EIA < 1,32 nmol/L < 4,0 µg/L
- ELISA < 1,06 nmol/L < 3,2 µg/L
- Manual Tietz (1990) 0,26-0,62 nmol/L 0,78-1,89 µg/L

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

Bibliografía

1. de Diabetes, A. L. (2016). ALAD. *Guía de Diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2*, 39-42.
2. del Castillo Tirado, R. A., López, J. A. F., & del Castillo Tirado, F. J. (2014). Guía de práctica clínica en el pie diabético. *Archivos de medicina*, 10(2).
3. Mata-Cases, M., Artola, S., Escalada, J., Ezkurra-Loyola, P., Ferrer-García, J. C., Fornos, J. A., ... & Rica, I. (2015). Consenso sobre la detección y el manejo de la prediabetes. Grupo de Trabajo de Consensos y Guías Clínicas de la Sociedad Española de Diabetes. *Avances en Diabetología*, 31(3), 89-101.
4. Benzádon, M., Forti, L., & Sinay, I. (2014). Actualización en el diagnóstico de la diabetes. *Medicina (Buenos Aires)*, 74(1), 64-68.
5. Guisasola, F. Á., Menéndez, S. A., San Martín, J. E., Jiménez, F. E., Loyola, P. E., García, J. F., ... & Cases, M. M. (2015). Consenso sobre la detección y el manejo de la Prediabetes. Grupo de Trabajo de Consensos y Guías Clínicas de la Sociedad Española de Diabetes. Consensus on the detection and management of Prediabetes. Consensus and Clinical Guidelines Working Group of the Spanish Diabetes Society. *Rev Esp Endocrinol Pediatr*, 6(1), 21-38.
6. Silvio E. I. Diagnosis of Diabetes . The new England Journal of Medicine- Reino Unido. Ago-2012. Disponible en file:///C:/Users/Usuario/Downloads/diagn%C2%A5stico_de_diabetes.pdf
7. Voto I, Nicoletti A, Salcedo L y et al .Consenso de diabetes Recopilación, actualización y recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes gestacional. Buenos Aires Sep 2012 -FASGO. Disponible en <http://www.fasgo.org.ar/archivos/consensos/diabemb.pdf>
8. De Diabetes, A. L. (2007). Consenso latinoamericano de diabetes y embarazo. *La Habana, Cuba*, 55-69.
9. Guías ALAD sobre el diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes tipo 2 con medicina basada en evidencia -Edición 2013- disponible en https://issuu.com/alad-diabetes/docs/guias_alad_2013
10. Prevención, diagnóstico y tratamiento temprano de la Nefropatía Diabética Recomendaciones de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) Avalado por la Sociedad Latinoamericana de Nefrología e Hipertensión (SLANH) -Consensos ALAD <http://alad-americalatina.org/wp-content/uploads/2016/10/PREVENCIÓN-DE-NEFROPATIA.pdf> Manual de automonitoreo de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD).
11. Consensos ALAD. <http://alad-americalatina.org/wp-content/uploads/2016/10/AUTOMONITOREO-PARA-DIABETES.pdf> figueredoc. El transportador de zinc 8: repercusiones de su polimorfismo en la diabetes tipo 2, y en las variantes tipo 1/LADA-chaco, arg 2010. Disponible en file:///C:/Users/Usuario/Downloads/transportador_zinc_y_autoanticuerpos.pdf

12. Rodbard, H. W., & Jellinger, P. S. (2012). Comment on: Inzucchi et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Patient-Centered Approach. Position Statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2012; 35: 1364–1379. *Diabetes care*, 35(10), e70-e70.
13. Ministerio de Salud -Presidencia de la Nacion- Guía Práctica Clínica Nacional sobre Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la TIPO 2 MELLITUS DIABETES –Buenos Aires 2012. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000076cnt-2012-08-02_guia-breve%20-prevencion-diagnostico-tratamiento-diabetes-mellitus-tipo-2.pdf
14. KILPATRICK E, MAYLOR P, KEEVILB . Biological Variation of Glycated Hemoglobin. Implications for diabetes screening and monitoring-Reino Unido- DIABETES CARE, VOLUME 21, NUMBER 2, FEBRUARY 1998
15. Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., ... & Matthews, D. R. (2015). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care*, 38(1), 140-149.
16. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES—2017 -Diabetes Care VOLUME 40 | SUPPLEMENT 1
17. Anticuerpos antiisletos pancreáticos (ICA) y antiinsulina (AAI) en el síndrome hipoglicémico funcional reactivo E. Cabrera-Rode1, G. Molina1, Oscar díazhorta1, O. Faget1, A. Hernández1, M. Vera1, R. González1, C. Arranz1, D. Navarro1, E. Gort2, H. Caseres3, I. Márquez4, M. Romero5, P. González6, D. Machado7, A. Seuc1 -AV DIABETOL 1996; 12: 38-47
18. Maximino Ruiz. Diabetes Mellitus. LIBRERIA AKADIA EDITORIAL. ISBN: 9789875701533

ANEXO: Modelo de Informes

LABORATORIO

NOMBRE:

FECHA

ORDEN N°:

DNI:

FECHA DE NACIMIENTO:

MEDICO SOLICITANTE:

Prueba de Tolerancia Oral a la glucosa (PTOG)

Carga de glucosa: 75 gr

Método:

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

Firma y sello del Bioquímico

GLOSARIO

ADA: Asociación Americana de Diabetes

ALAD: Asociación Latinoamericana de Diabetes

SAD: Sociedad Argentina de Diabetes

IDF: Federación Internacional de Diabetes

EASD: Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes

GTDE: Grupo de Trabajo de Diabetes y Embarazo

EDTA: Acido Etilendiaminotetraacético

HbA1c: Hemoglobina Glucosilada o Glicosilada

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

HTA: Hipertensión Arterial

IECA: Inhibidores de ECA

IDF: Federación Internacional de Diabetes

IFCC: Federación Internacional de Bioquímica Clínica y Laboratorio en Medicina

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

NKDEP: Programa Nacional de Educación en Enfermedad Renal

PTOG: Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa

OMS: Organización Mundial de la Salud

NICE: National Institute For Health and Clinical Excellence