

Guía Teórico-Práctica:  
**BIOQUÍMICA CLÍNICA**  
PARTE 3

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia-UNSL



MATERIAL DIDÁCTICO  
PARA ESTUDIANTES  
2024

# SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

## Guía de Trabajos Prácticos: **BIOQUÍMICA CLÍNICA** **PARTE 3**

Licenciatura en Bioquímica

Autores

Dra. MYRIAM LILIANA FORNERIS (UNSL)

Dr. LUIS ALBERTO PALAORO (UBA)

Dra. MARÍA FLORENCIA FIGUEROA (UNSL)

Bioq. FLORENCIA CABRAL (UNSL)



FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2024

## RESPONSABLES DE LA PUBLICACIÓN

Decano

*Dra. Sebastián ANDUJAR*

*Secretaria Académica*

*Dra. Mónica OLIVELLA*

*Comisión de la Serie Didáctica:  
Material Didáctico para Estudiantes*

Coordinadora

*Dra. Yamina DÁVILA*

Integrantes

Departamento de Biología

Mg. Karina Ethel MARCHEVSKY

Dra. María Beatriz NÚÑEZ

Departamento de Bioquímica

*Dra. Verónica FILIPPA*

*Dra. Ethelina CARNELUTTI*

Departamento de Farmacia

*Dra. Cecilia PERALTA*

*Dra. Ana VICARIO*

Departamento de Química

*Dr. José A. BOMBASARO*

*Dra. Cinthya A. MAGALLANES NOGUERA*

Edición

*Secretaría de Investigación, Vinculación y Extensión*

## SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N°269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudio dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acordes al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL (<http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mde.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

## PRESENTACIÓN DEL CURSO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA I

La presente guía de temas teóricos de aplicación práctica en el laboratorio clínico pertenece a la asignatura **BIOQUÍMICA CLÍNICA I** que se enmarca en el Ciclo Profesional del Plan de Estudio (11/10) de la Carrera de Licenciatura en Bioquímica. El Curso se dicta en el segundo cuatrimestre de 5° año (noveno cuatrimestre), es de carácter obligatorio y posee un crédito horario de 150 horas.

**Requisitos para cursar Bioquímica Clínica I.** El alumno deberá tener regularizadas las asignaturas: Bacteriología y Virología, Parasitología y Química Biológica Patológica. Para rendir debe aprobar previamente las mencionadas materias y la Práctica Profesional.

**Modalidad de cursada.** El Programa del Curso se desarrollará mediante el dictado de *clases teóricas* y *clases prácticas*, que comprende por semana: dos clases teóricas (4 h), explicación teórica de trabajos prácticos (2 h), un trabajo prácticos de laboratorio y/o de aula para la resolución de problemas de aplicación o casos clínicos (3 h) y seminarios de integración y actualización que incluyen la discusión de casos clínicos. De acuerdo con la reglamentación vigente, la regularización de la materia se logrará con el 80% de asistencia a las actividades obligatorias y con la aprobación de dos evaluaciones parciales que se realizarán a lo largo del cuatrimestre.

Esta Guía tiene como objetivo primordial presentar, de manera didáctica los contenidos de formación que corresponden a los temas del programa analítico de la asignatura Bioquímica Clínica I. Se describe, en forma detallada y actualizada: 1) las principales técnicas inmunoquímicas utilizadas en el laboratorio clínico y los principios de la automatización; 2) los mecanismos fisiopatológicos, moleculares y las pruebas de laboratorio de las enfermedades relacionadas con el tracto gastrointestinal y 3) el estudio integral de los líquidos de punción y de las alteraciones asociadas a patologías humana.

El desarrollo de cada tema incluye los objetivos de aprendizaje y se acompaña con tablas, ilustraciones y esquemas para una mejor comprensión y la bibliografía recomendada.

Esta presentación es la continuación de las guías titulada “Guía Teórico-Práctica de Bioquímica Clínica I”, editadas por MDE en 2018 y 2022, respectivamente y representa nuestro deseo de promover en los/las estudiantes el pensamiento crítico y reflexivo, a fin de jerarquizar la profesión a la luz del avance del conocimiento y de los recursos tecnológicos, pero sin dejar de lado el factor humano, y destacando el rol social del Bioquímico como integrante esencial del equipo de salud.

Nuestro agradecimiento profundo al **Prof. Dr. Luis Alberto Palaoro** (Profesor Consulto, Área de Citología, Departamento de Bioquímica Clínica II, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires), colega siempre generoso, quien contribuyó, con su invaluable experiencia, al proceso de redacción de esta guía.

## **INDICE**

Presentación de la Asignatura	I
<b>Tema 1</b>	
<b>TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS</b>	
Objetivos	1
Introducción Teórica	1
Bibliografía	31
<b>Tema 2</b>	
<b>AUTOMATIZACIÓN EN QUÍMICA CLÍNICA</b>	
Objetivos	32
Introducción Teórica	32
Bibliografía	57
<b>Tema 3</b>	
<b>ENFERMEDADES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL. FISIOPATOLOGÍA Y LABORATORIO</b>	
Objetivos	58
Introducción Teórica	58
Resolución de Casos Clínicos	113
Bibliografía	114
<b>Tema 4</b>	
<b>LÍQUIDOS DE PUNCIÓN</b>	
Objetivos	115
Introducción Teórica	115
Resolución de Casos Clínicos	150
Bibliografía	152

## CAPÍTULO I TÉCNICAS IMUNOQUÍMICAS



### OBJETIVOS

- Reconocer y clasificar a inmunoensayos.
- Comprender el fundamento de los diferentes inmunoensayos que se utilizan en los laboratorios de análisis clínicos.
- Conocer los sistemas de amplificación de señales y la expresión de los resultados de un inmunoensayo.

### INTRODUCCIÓN

Los métodos inmunoquímicos engloban un conjunto de técnicas analíticas en las que la sustancia a detectar (analito) es identificada y cuantificada mediante su reconocimiento molecular por un anticuerpo (Ac) capaz de unirse a ella con una elevada afinidad y especificidad.

En el contexto de la generación de Ac con fines analíticos, estos pueden clasificarse en tres tipos según su origen:

- Policlonales: se obtienen a partir del suero sanguíneo del animal inmunizado, y constituyen una mezcla compleja y heterogénea de todos los tipos de Ac generados frente a un mismo inmunógeno, cada uno de ellos procedente de un clon de linfocitos B distinto y por tanto con una afinidad y especificidad diferente. Por ello, sus características representan un promedio de la respuesta inmunitaria del animal. Su obtención es relativamente sencilla y económica, pero presentan como principal inconveniente su carácter limitado y su escasa reproducibilidad debido a la variabilidad inherente al proceso de inmunización.

- Monoclonales: son inmunoglobulinas (Ig) obtenidas *in vitro* mediante la generación y cultivo de hibridomas, las cuales derivan de la fusión de un linfocito B con una célula de mieloma. Las moléculas de Ac obtenidas a partir de una línea de hibridoma serán idénticas y tendrán las mismas propiedades de unión. En consecuencia, la tecnología de hibridomas garantiza una fuente ilimitada y reproducible de Ac con unas características constantes. Su generación es más compleja y costosa, pero resultan más valiosos desde un punto de vista biotecnológico.

- Recombinantes: se obtienen mediante técnicas de biología molecular, ya sea partiendo de librerías génicas sintéticas o semisintéticas, o bien a partir de los genes codificantes de Ac

procedentes de líneas de hibridomas preestablecidas. La posterior clonación y expresión de estos genes en otros organismos da lugar a Ac con propiedades bien definidas cuyo sitio de unión es susceptible de ser modificado por mutagénesis.

Si bien la interacción primaria Ag-Ac no es visible, existen métodos que hacen posible la visualización (revelado de la reacción) a través del empleo de Ag o el Ac marcado, hecho que incrementa la sensibilidad de la técnica. Los marcadores utilizados en los inmunoensayos (IE) son de naturaleza diversa: fluorocromos (fluoroimmunoensayos, FIA), isótopos radiactivos (radioinmunoensayos, RIA), enzimas (inmunoensayo enzimático, EIA), nanopartículas coloreadas, etc. (Tabla 1). La elección de la técnica dependerá de las características de la sustancia a cuantificar y de las condiciones del laboratorio.

Los analitos que se miden pueden ser aquellos que intervienen en la homeostasis corporal (Ej.: hormonas), los que el cuerpo produce pero no están presentes (Ej.: marcadores tumorales), o aquellos que no existen en el cuerpo y son incorporados en forma exógena (Ej.: droga de abuso).

Tabla 1. Marcadores empleados en inmunoensayos (Kricka LJ y Parj JI, 2014).

Compuesto Quimioluminiscente	Éster de acridinio, luminol
Compuesto Electroquimioluminiscente	Tris(bipiridil)-rutenio <sup>2+</sup>
Enzima	Fosfatasa alcalina, peroxidasa, β-galactosidasa
Fluorocromo	Quelatos de europio, fluoresceína
Radioisótopo	<sup>125</sup> I, tritio
Metal	Oro, plata, selenio
Partícula	Glóbulos rojos, látex, carbón
Polinucleótido	ADN

### Clasificación de los inmunoensayos

Los IE, de acuerdo al diseño aplicado para medir la fracción de ocupación o de unión del Ac, pueden clasificarse en: a) **Competitivos** y b) **No competitivos**.

a) Los IE **no competitivos** (ensayos tipo *sandwich*) permiten la detección del Ag empleando dos Ac diferentes capaces de reconocer epítopes distintos del Ag. En estos ensayos generalmente uno de los Ac es inmovilizado en un soporte sólido utilizado para la captura del Ag y el segundo Ac se encuentra conjugado (marcado), y es el que provoca la generación de la señal al quedar retenido por la presencia del Ag (Fig. 1).

Estos ensayos se denominan inmunométricos porque reacciona todo el analito presente en la muestra. Los reactivos se adicionan en exceso con el fin de favorecer las interacciones Ag-Ac y alcanzar la mayor sensibilidad posible. Las cantidades residuales de reactivo son eliminadas en etapas de lavado. La generación de señal por parte del segundo Ac es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra (la ausencia de analito

se corresponde a señal 0). El mismo fundamento se aplica para valorar un Ac en una muestra, pero trabajando con Ag marcados.

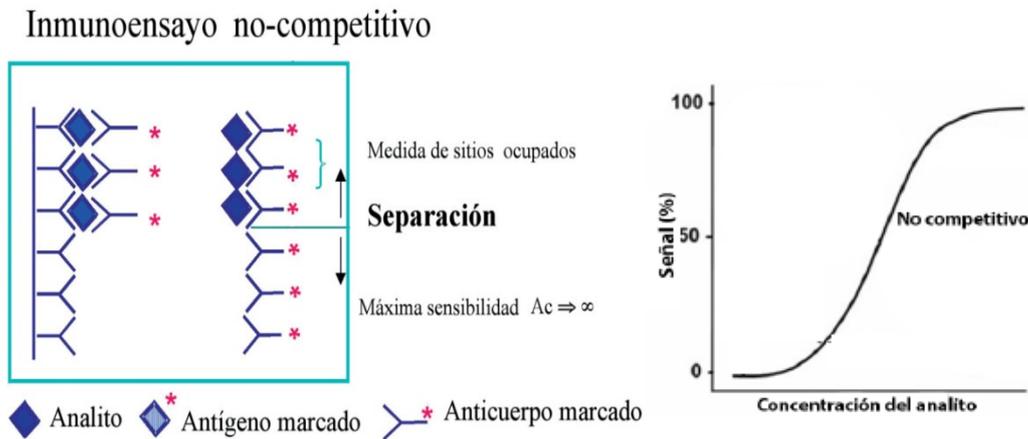


Figura 1. Ensayo inmunométrico no competitivo. La máxima sensibilidad de la reacción se alcanza con altas concentraciones de Ac, es decir cuando el mismo tiende a infinito. La ventaja de los ensayos inmunométricos, con exceso de Ac es que los errores del pipeteo no son críticos y que la reacción puede completarse en tiempos menores. La señal generada es directamente proporcional a la cantidad de analito capturado (Fisiopatología Endocrina: Bioquímica y Métodos Diagnósticos. Separata Montpellier, 2015).

**b)** En los IE **competitivos** solo un Ac es utilizado para el reconocimiento, y el Ag presente en la muestra debe competir con Ag estándar o un análogo químico del Ag por los sitios de unión al Ac. En este tipo de ensayos el Ac está en defecto; por consiguiente, una parte de la muestra permanece siempre sin reaccionar y la señal generada es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra (Fig. 2).

Los ensayos competitivos se consideran menos eficientes que los formatos no competitivos, empleándose en general para detectar moléculas de bajo peso molecular (haptenos), ya que al ser pequeñas no pueden ser reconocidas por dos Ac en simultáneo.

Por otra parte, según exista la necesidad de separar o no los compuestos del ensayo que reaccionaron de aquellos que no reaccionaron, los IE se clasifican en: I) **Heterogéneos** y II) **Homogéneos** (Fig. 3).

**I)** En los IE **heterogéneos** es preciso separar los inmunocomplejos formados de las moléculas que queden libres. Para ello, alguno de los componentes de la reacción (el Ag o el Ac) se encuentra inmovilizado en fase sólida (Ej: microplacas de poliestireno o esferas magnéticas, colorimétricas, químicas, etc.) y la separación de las moléculas libres se consigue mediante pasos de lavados. La remoción de los reactivos no unidos permite disminuir las adherencias inespecíficas que, de hallarse presentes, podrían aumentar la señal ruido de fondo y afectar los límites de detección del ensayo.

### Inmunoensayo competitivo



Figura 2. Ensayo inmunométrico competitivo. Se miden los sitios del Ac libres del analito y por lo tanto los sitios ocupados por la hormona son calculados implícitamente. Los sitios del Ac no ocupados se evidencian por unir la misma hormona marcada, o en ciertos casos utilizando Ac antiidiotipos. En este tipo de ensayos, el Ac está siempre en defecto y para obtener una sensibilidad máxima la concentración del mismo debe tender a cero. La señal generada es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en muestra. (Fisiopatología Endocrina: Bioquímica y Métodos Diagnósticos. Separata Montpellier, 2015).

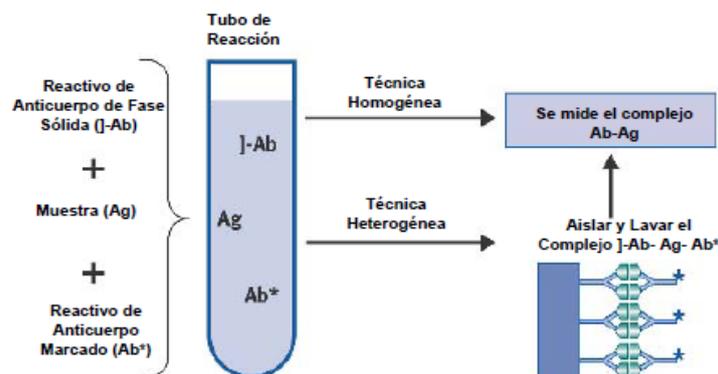


Figura 3. Inmunoensayos homogéneos y heterogéneos. (Abbott División Diagnóstico).

II) En los IE **homogéneos** la reacción Ac-Ag puede traducirse directamente en una señal sin necesidad de separar físicamente los reactivos intervinientes. Suelen utilizarse en la determinación de analitos de bajo peso molecular, como por ejemplo drogas de abuso y terapéuticas. La mayoría de los IE homogéneos utilizan marcas enzimáticas: EMIT (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*) o fluorescentes: FPIA (*Fluorescence Polarization ImmunoAssay*).

El hecho de que no se requiera la separación de las fracciones libre y unida en el medio de reacción, luego de la unión Ag-Ac, se relaciona con eventos como: a) cambios conformacionales de las enzimas; b) inhibición de la actividad enzimática; c) sustrato marcado con fluorescencia y d) transferencia de energía fluorescente, protección o polarización.

## TECNOLOGÍAS DE DETECCIÓN

En los IE, la reacción Ag-Ac se encuentra acoplada a un sistema de generación de señal que traduce esta interacción en una lectura cuantitativa. La marca empleada para generar dicha señal puede ser: a) **isotópica** o b) **no isotópica** (enzimática, fluorescente, quimioluminiscente o electroquimioluminiscente). Alrededor del 80% de los autoanalizadores actuales usan señal quimioluminiscente o electroquimioluminiscente, y el resto utiliza fluorometría o son inmunoanálisis enzimáticos.

### Radioinmunoanálisis (RIA)

Hasta el año 1960, los métodos analíticos disponibles eran fundamentalmente de tipo colorimétrico y sólo permitían medir concentración de sustancias en líquidos orgánicos del orden de gramos, miligramos y en el mejor de los casos, microgramos.

La aparición del radioinmunoanálisis (RIA) o radioinmunoensayo aportó un extraordinario avance a la medicina, y en especial para la endocrinología. Esto se debió a la labor desarrollada por dos investigadores estadounidenses, Rosalyn Sussman Yalow y Salomon Berson. Ellos fueron los primeros en observar la gran sensibilidad de los métodos basados en la reacción entre Ag y Ac mediante el uso de marcadores radioisotópicos, lo que permitió contar con técnicas para medir en forma confiable concentraciones de sustancias que se hallaban en el orden de nanogramos ( $10^{-9}$ ) o picogramos ( $10^{-12}$ ).

El RIA representa el ejemplo clásico de IE competitivos; se basa en una reacción Ac-Ag donde están presentes en el medio de reacción dos formas del Ag: el Ag frío (Ag) y el Ag marcado con un radioisótopo ( $Ag^*$  o Ag caliente). El  $Ag^*$  se conforma sustituyendo algunos de sus átomos por los correspondientes isótopos radiactivos ( $^3H$ ), o introduciendo radioisótopos en la molécula ( $^{125}I$ ). RIA es una técnica en que el Ag que se desea determinar compete con una cantidad fija de  $Ag^*$  adicionado, en igualdad de condiciones, por la unión a una cantidad limitada de Ac (en defecto). La afinidad de unión de ambos Ag (frío y caliente) por el Ac ha de ser la misma (Fig. 4):



Después de producida la reacción, se debe separar la fase unida de la libre. Existen diferentes métodos de separación, basados en las distintas propiedades del Ag libre y del complejo Ag-Ac (Tabla 2). La modalidad que implica la inmovilización del Ac a un soporte sólido (Ej.: paredes del tubo de reacción) es cada vez más empleada debido a su sencillez, ya que la separación se consigue simplemente aspirando el medio de incubación.

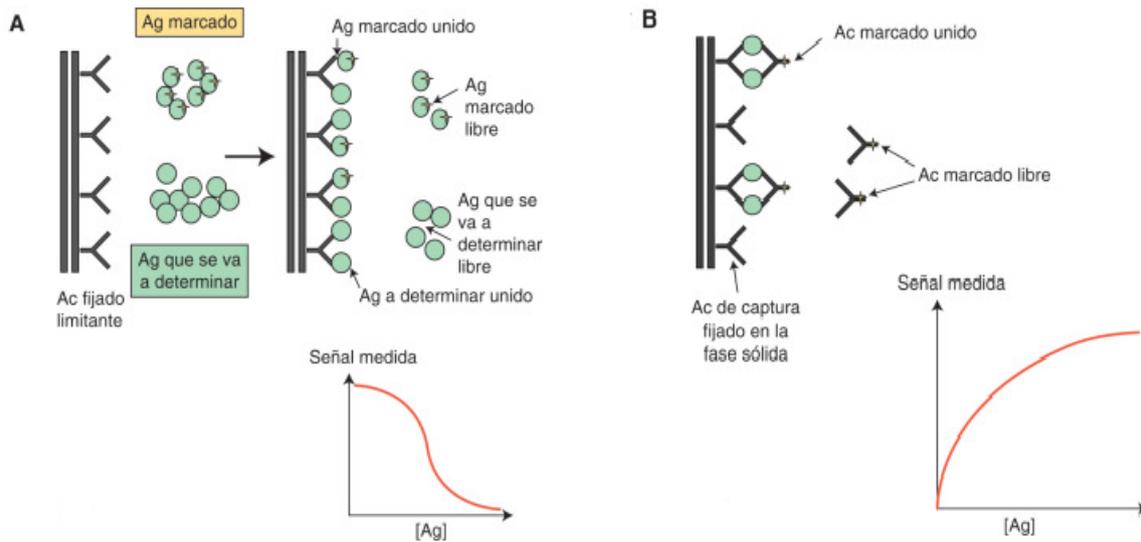
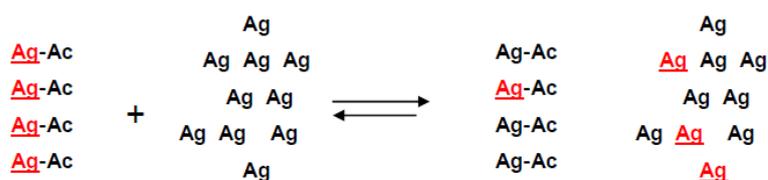


Figura 4. A) Principio básico del RIA y B) Principio básico del IRMA. (Trabado y col., 2019. Ginecología endocrina: métodos de determinación, exploración dinámica y molecular. EMC - Ginecología-Obstetricia 2019 (55); 1-13. Doi: 10.1016/S1283-081X(19)42000-6).

Tabla 2. Diferentes métodos para la separación de la fracción de Ag que queda unida al Ac respecto de la fracción que queda libre (Bioquímica. Técnicas y Métodos. Roca y col., 2003).

BASES DEL MÉTODO	MATERIAL USADO
<b>Adsorción del antígeno libre</b>	Recubrimiento de carbón Resina de intercambio iónico
<b>Precipitación de antígeno ligado</b>	
- químico	Sulfato sódico Polietilén glicol 6000
- inmunológico	Precipitación con doble anticuerpo
<b>Fase sólida</b>	
Primer o segundo anticuerpo acoplados a una matriz sólida	Tubos de ensayo, geles de dextrano, lechos de vidrio, celulosa

Con una serie de estándares se construye una curva de calibración, en que la cantidad de señal generada será inversamente proporcional a la cantidad de Ag en la muestra del paciente. Por ejemplo, si la concentración de Ag frío es mayor, se producirá el desplazamiento del Ag\* y por lo tanto, la radioactividad de los complejos Ag-Ac irá disminuyendo, mientras que la radioactividad de la fracción de Ag libre aumentará.



Referencia: Ag: antígeno caliente. Ac: anticuerpo específico. Ag: antígeno frío.

La radiactividad (cuentas por minuto-cpm) de la fase unida se cuantifica utilizando un contador gamma, si el isótopo utilizado para marcar es  $^{125}\text{I}$ , o un contador beta en el caso de haber marcado con tritio ( $^3\text{H}$ ). La señal máxima ( $B_{\text{max}}$ ) corresponde al estándar cero. Los datos se pueden representar: Unido/Libre frente a la concentración de Ag o Logit % unido/ $B_{\text{max}}$  frente a la concentración de Ag o su logaritmo, en que la curva de calibración se convierte en lineal (Fig. 5).

TESTO	cpm	B/Bo (%)
Cuentas Totales	56034	
Calibrador 0,00 ng/dL	28383	100,0
11,0 ng/dL	20016	70,5
48,0 ng/dL	13255	46,7
155,0 ng/dL	7756	27,3
540,0 ng/dL	3495	12,3
1640,0 ng/dL	1678	5,9

$$B/Bo(\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrador ó muestra)}}{\text{Cuentas (Calibrador Cero)}} \times 100$$

Figura 5. Ejemplo de los resultados de una curva de calibración. Una cantidad fija de la hormona testosterona (TESTO) marcada con  $^{125}\text{I}$  compete con el TESTO presente en el calibrador, por los puntos de unión del Ac inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de TESTO de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración. Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.

### Ensayo Inmuno radiométrico (IRMA)

Durante los años ochenta aparecieron modificaciones a la primera generación de IE a través de la introducción de los **análisis inmunométricos no competitivos (IRMAs)**, que utilizaban dos Ac monoclonales dirigidos contra dos epitopes diferentes de la molécula que se deseaba determinar (Figura 4). El primer Ac está adherido al interior de las paredes del tubo y el segundo Ac está marcado radiactivamente para la detección. La molécula a medir, que está en el suero del paciente, se une a los dos Ac formando un complejo Ac-Ag-Ac que emite radiactividad, la cual se mide. Algunos kits incorporan un tratamiento ácido previo para la separación de las proteínas transportadoras. Con la incorporación del doble Ac se consiguió mayor especificidad, sensibilidad, ampliar el intervalo de medición y acortar los tiempos de incubación.

En la actualidad los ensayos isotópicos se emplean con menos frecuencia que otros tipos de IE, debido a que el trabajo con isótopos radiactivos implica contar con una infraestructura de laboratorio apropiada, permisos específicos (Ej.: Comisión de Energía Atómica-CNEA) y un tratamiento adecuado de los residuos radiactivos. Hormonas como 17-hidroxiprogesterona, insulina, IGF-1 o testosterona, continúan determinándose por RIA o IRMA en algunos laboratorios de bioquímica clínica.

## Fluoroimmunoanálisis

Los fluoroimmunoanálisis emplean compuestos que emiten fluorescencia (fluorocromos) para el marcaje. La fluorescencia es la cualidad de algunas moléculas que absorben luz de una determinada longitud de onda y emiten luz de una longitud de onda mayor que la absorbida. Las longitudes de onda absorbida y emitida son características de cada fluorocromo.

Las variables que afectan la fluorescencia son: el rendimiento cuántico, la fluorescencia de fondo, la estructura del compuesto, el *quenching* (depende de sustancias disueltas, concentración, temperatura, pH), la dispersión de la luz, y la diferencia entre los espectros de excitación y emisión. Un marcador fluorescente debe poseer una alta intensidad de emisión, la misma deberá distinguirse del fondo y poseer un corrimiento de Stokes (diferencia de energía entre el pico de excitación y el de emisión) importante. Asimismo, la marca no debería afectar las propiedades inmunológicas y reactivas del sistema; deberá ser soluble en agua y tener buena estabilidad aún conjugada.

Se han utilizado diferentes recursos para mejorar la sensibilidad de los ensayos fluorescentes:

- a) El principio de resolución temporal para separar las interferencias del fondo, desarrollado en los ensayos **DELFLIA** (*Dissociation-Enhanced Lanthanide FluoroImmunoAssay*) que utilizan lantánidos, fundamentalmente  $\text{Eu}^{+3}$ , como sustancia marcadora. Pueden ser competitivos (FIA) y no competitivos (IFMA) (Fig. 6).

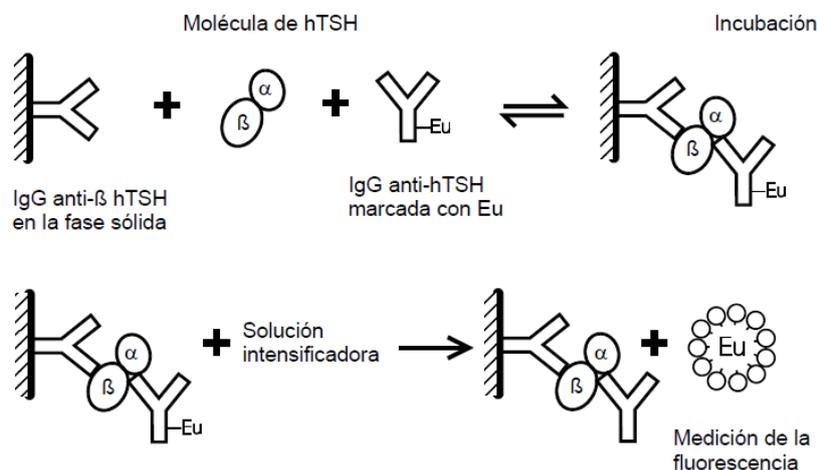


Figura 6. Ensayo DELFLIA para TSH neonatal. Es un ensayo en fase sólida, fluoroinmunométrico de dos sitios. Los calibradores, los controles y las muestras que contienen TSH se hacen reaccionar simultáneamente con los Ac monoclonales inmobilizados, dirigidos contra un sitio antigénico específico de la subunidad β de TSH y con los Ac monoclonales marcados con europio (Eu) (dirigidos contra un sitio antigénico diferente localizado parcialmente en la subunidad β y parcialmente en la subunidad α). La solución intensificadora disocia los iones de Eu del Ac marcado en una solución donde éstos forman con los componentes de dicha solución quelatos fluorescentes. La fluorescencia producida en cada muestra es proporcional a la concentración en la muestra de TSH (Catálogo DELFLIA® Neonatal hTSH kit, PerkinElmer- Turku, Finlandia).

b) En los ensayos **MEIA** (*Microparticle Enzyme ImmunoAssay*), durante la incubación, los analitos se unen a micropartículas esféricas para aumentar la superficie de contacto. La señal se amplifica utilizando enzimas como la fosfatasa alcalina. Se forma un complejo inmune conjugado con la enzima que se separa por fijación a una matriz de fibra de vidrio inerte y se evidencia mediante el agregado del sustrato, 4-methylumbelliferyl fosfato (4-UP), con excitación a 365nm. Se mide el producto fluorescente, methylumbelliferone (MU).

c) Los ensayos **FPIA** (*Fluorescence Polarization ImmunoAssay*) son fluoroensayos competitivos homogéneos. Se basan en la disminución de la intensidad de la luz polarizada en presencia del complejo inmune. Cuando una molécula fluorescente es excitada con luz polarizada, la emisión depende de la propiedad rotacional de la molécula. Una pequeña molécula como un Ag marcado con fluorescencia, rota más rápido en solución que una gran molécula, tal como un complejo Ac-Ag. Cuando la luz polarizada excita una pequeña molécula, la cual está rotando rápidamente, la señal de polarización disminuye más que aquella que incide en una gran molécula.

En un FPIA competitivo, el agregado del Ag de la muestra compite con el Ag marcado con fluorescencia por los sitios de unión del Ac. Al aumentar la concentración del Ag no marcado, se detecta mayor cantidad de Ag marcado con fluorescencia (Fig. 7), por lo tanto, la señal de polarización disminuye.

Los primeros métodos semiautomatizados fueron FPIA, aplicados a hormonas tiroideas.

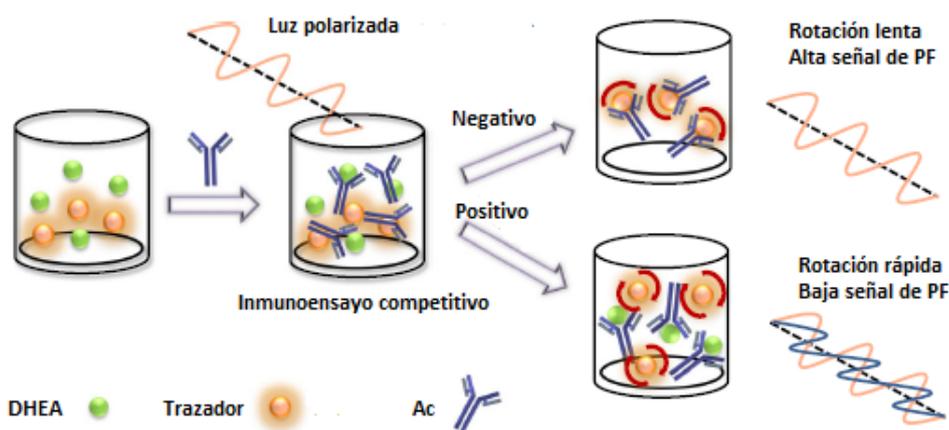


Figura 7. Principio básico de un FPIA competitivo para la determinación de DHEA en orina. En ausencia de DHEA, el hapteno marcado con fluorescencia (trazador) se une con el Ac específico. El complejo Ac-Trazador rota lentamente al ser excitado con luz polarizada, exhibiendo alta polarización de fluorescencia (PF). Por el contrario, en presencia de una muestra que contiene DHEA, se produce una competencia con el trazador por los sitios de unión al Ac, formándose así el complejo Ac-DHEA y quedando en el medio de reacción un mayor número de moléculas del trazador libre. El trazador libre gira rápidamente al ser excitado con luz polarizada, provocando una disminución de la señal (Yang y col., 2021. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2021; 413:4459-69).

### Inmunoensayo enzimático (EIA)

Este tipo de ensayos emplean una enzima como marcador del Ag o del Ac en lugar de un radioisótopo y, dependiendo del sustrato, pueden generar señales de color visible, fluorescentes o luminiscentes (Tabla 3).

Los productos fluorescentes y luminiscentes brindan generalmente una mayor sensibilidad, detectabilidad y permiten una mayor dilución de los inmunoreactantes, así como una reducción del tiempo de ejecución de los ensayos y del volumen de reacción. Sin embargo, la colorimetría sigue siendo el método más empleado debido a la posibilidad de evaluación visual, equipamiento más sencillo y mayor estabilidad de los productos formados.

Tabla 3. Enzimas de uso común en los inmunoensayos enzimáticos y tipos de ensayo en que se utilizan (según el tipo de señal emitida) y sus límites de detección (en zeptomoles:  $10^{-21}$  moles). Bioquímica. Técnicas y Métodos. Roca y col., 2003. Editorial Hélice. ISBN: 84-921124-8-4.

Enzima	Método de detección y límite (zeptomoles)	
Fosfatasa alcalina	Fotométrico	50.000
	Fluorescente	300-100
	Quimioluminiscente	1
Peroxidasa de rábano picante	Fotométrico	2.000.000
	Quimioluminiscente	25.000
Glucosa-6-P deshidrogenasa	Quimioluminiscente	1.000
$\beta$ -galactosidasa	Quimioluminiscente	5.000
	Fluorescente	1.000

Los EIA se desarrollan en dos etapas: una primera etapa inmunológica, en la que tiene lugar la reacción Ac-Ag, y una segunda etapa en la que se determina la actividad de la enzima marcadora, una vez añadido el sustrato de la reacción catalizada por ella. La disminución de la cantidad de sustrato o el incremento de la cantidad de producto se utiliza para cuantificar la reacción Ac-Ag.

Probablemente, la enzima más empleada para la preparación del trazador sea la **peroxidasa** de rábano picante (HRP, *horseradish peroxidase*). Su tamaño pequeño (40 KDa) facilita su conjugación con Ac secundarios específicos o estreptavidina. En presencia de  $H_2O_2$ , la HRP promueve la oxidación de ciertos sustratos para dar lugar a productos con propiedades ópticas fácilmente detectables, siendo los más habituales el TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), la OPD (o-fenilenodiamina) y ABTS (2,2'-azino-bis), entre los cromogénicos, y el luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) entre los quimioluminiscentes. El producto verde ABTS tiene dos picos de absorbancia, 410 y 650 nm, mientras que el producto azul TMB se detecta mejor a 370 y 652 nm.

La fosfatasa alcalina (FA) es una enzima de gran tamaño (140 KDa), lo que dificulta la conjugación de más de dos moléculas a cada molécula de Ac y limita la cantidad de señal que puede ser generada. Dado que la FA hidroliza ésteres de fosfato, sustratos como el p-nitrofenil fosfato (PNPP) (cromogénico) o el 4-metil umbeliferil fosfato (4-MUP) (fluorogénico) son usados habitualmente. El PNPP produce un producto amarillo soluble en agua que absorbe a 405 nm. También se han utilizado otras enzimas, como la  $\beta$ -galactosidasa, la acetilcolinesterasa y la catalasa.

Entre los factores que afectan la medición de la actividad enzimática se destacan: temperatura, composición de la solución tampón (pH, fuerza iónica), acumulación de compuestos inhibidores, aumento de la reacción inversa a medida que se incrementa la concentración del producto, estabilidad de la enzima y exposición a la luz.

### **Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima - ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)**

ELISA es una técnica que permite la detección de Ag o Ac específicos en una muestra de interés, mediante una combinación de principios inmunológicos y enzimáticos. En este tipo de IE uno de los componentes de la reacción (Ag o Ac) está adsorbido a la superficie de una fase sólida, lo que facilita la separación entre la fracción retenida y la fracción libre.

Las microplacas, con sus múltiples variantes, constituyen los soportes más empleados en los ELISA. Aunque existe un gran número de materiales, el poliestireno es el más elegido por los fabricantes dada su excelente calidad óptica, por facilitar enlaces estables y por su dureza mecánica. Posterior a la inmovilización de uno de los inmunocomponentes, se realiza la adición de una solución de bloqueo (Ej.: albúmina sérica bovina, BSA) para cubrir todos los sitios de unión superficial no saturados de los pocillos de la microplaca, a fin de evitar la unión inespecífica.

Los ELISA permiten detectar moléculas de interés (hormonas, fármacos, péptidos y proteínas, vitaminas, agentes patógenos, autoanticuerpos, etc.) a concentraciones de pg/mL. Entre sus principales ventajas se encuentra su simplicidad, fácil lectura, rapidez, alta sensibilidad, adaptabilidad, bajo costo, seguridad y disponibilidad comercial, por lo que representa una técnica muy elegida tanto en investigación básica como en el diagnóstico bioquímico de rutina. Suero, plasma, orina, saliva o sobrenadantes de cultivos celulares son sólo alguna de las matrices que se utilizan habitualmente para estos ensayos.

Toda prueba de ELISA posee los siguientes componentes:

1. Un soporte para el Ag o Ac. Se utiliza una placa de poliestireno con 96 pocillos.
2. Un Ag o un Ac específico marcado con una enzima (conjugado).
3. Un sustrato que será transformado por la enzima en un producto detectable.
4. Un sistema para detectar dicho producto de reacción.

De acuerdo a su diseño, los ensayos de ELISA pueden ser: 1) Directos, 2) Indirectos, 3) Sándwich o de doble Ac y 4) de Inhibición competitiva (Fig. 8).

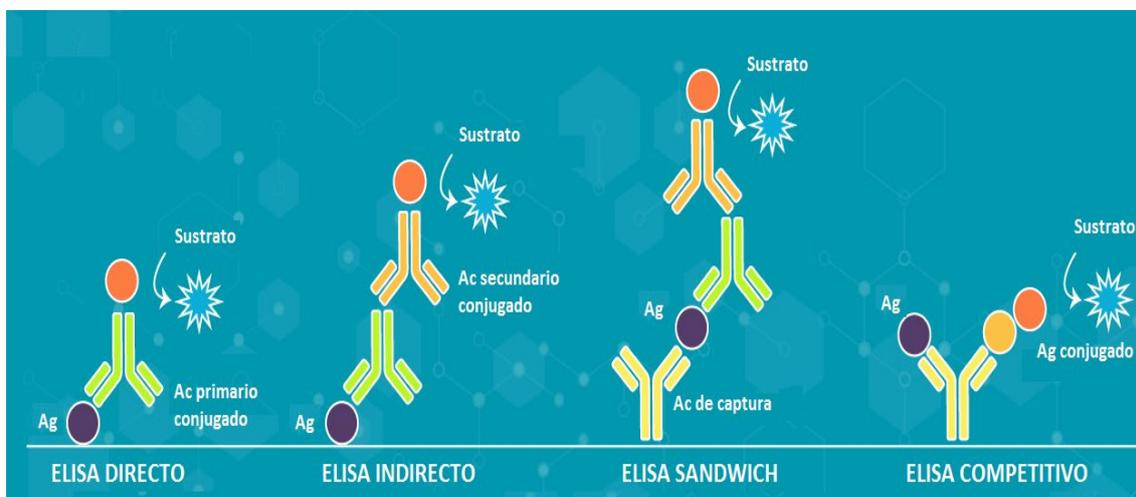


Figura 8. Diseño de los distintos tipos de ELISA (<https://www.news-courier.com/analysis//an-introduction-to-the-enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa-test-350024>).

En general, dependiendo del analito diana, pueden seleccionarse diferentes tipos de formatos de ELISA. Si se trata de una molécula pequeña, se desarrolla un ELISA competitivo, que puede ser directo o indirecto. En el **ELISA directo** competitivo, la competencia puede ocurrir entre un Ag no marcado (presente en los calibradores, controles y muestras de los pacientes) y un Ag marcado con una enzima (conjugado) por un número limitado de sitios de unión de Ac en la pared de los pocillos de la microplaca. Los procedimientos de lavado eliminan el material que no se ha unido. Después, se añade el sustrato de la enzima. La reacción enzimática se detiene añadiendo la solución de parada. La intensidad del color formado es inversamente proporcional a la concentración del analito en el suero del paciente.

Los **ELISA indirectos** son muy empleados en el laboratorio de autoinmunidad. Se fundamentan en el reconocimiento de Ac específicos presentes en las muestras de los pacientes mediante un Ac dirigido contra la región Fc humana de cualquier isotipo de inmunoglobulina (IgG, IgA o IgM). Los Ac anti-Fc están unidos a enzimas (Ej: peroxidasa, FA). Los Ag utilizados en las placas de ELISA pueden ser nativos, recombinantes (Ag completo o epítipo específico) o sintéticos (epítipo específico). Después de la interacción de los Ac de las muestras de los pacientes con el Ag adherido a la placa de ELISA, se realizan lavados para eliminar los Ac inespecíficos y se agrega el Ac anti-Ig humana unido a enzima, permitiendo la interacción por un tiempo determinado. Luego, se adiciona la solución que contiene el sustrato-cromogénico específico de la enzima (TMB para peroxidasa o p-nitrofenilfosfato para FA) el cual cambiará de color en función de la cantidad

de Ac conjugados con enzima. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de Ac del paciente unido al Ag.

Los **ELISA tipo sandwich** representan la forma más empleada para la detección de Ag. El soporte tiene unido un Ac específico contra el Ag que se está buscando. En un primer paso, se agrega la muestra del paciente y, si el Ag está presente, se unirá al Ac de captura. Luego del paso de lavado, se agrega un segundo Ac conjugado con una enzima, que se une específicamente al Ag de interés, pero en un epítipo distinto. Luego de una segunda fase de lavado, en la que se elimina todo el conjugado que no se unió, se agrega el sustrato, que se transforma en un producto detectable si el conjugado está presente.

Otra variante de la técnica, el ELISA de sándwich indirecto, utiliza tres Ac. En este caso, el tercer Ac es una anti-Ig humana conjugada con la enzima que se une al segundo Ac específico contra el Ag. Tiene la ventaja de usar un mismo conjugado para todas las pruebas de detección en las que se aplique la metodología debido a que el Ac con especificidad por el Ag buscado en la prueba no es el que está unido a la enzima. De esta manera, se evita el costoso proceso de tener que conjugar a la enzima con cada Ac específico, según el Ag que se esté buscando en la prueba.

#### Lectura de los ELISA

Independiente del tipo de ELISA utilizado, todos terminan en un paso de detección. Un lector de microplacas de absorbancia es un equipo capaz de detectar y cuantificar los fotones de luz absorbidos/transmitidos por una muestra líquida presente en una microplaca, cuando se expone a la luz en una longitud de onda específica.

A diferencia de la fluorescencia y la luminiscencia, la detección de absorbancia es una medida absoluta cuantificada en densidades ópticas (DO). La DO se define como la relación logarítmica entre la intensidad de la luz que golpea una sonda y la intensidad de la luz transmitida a través de ella. Alternativamente, también se puede utilizar la transmisión, la porción de luz que pasa por la muestra (Fig. 9).

Los lectores ELISA son capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la microplaca. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura pocas longitudes de onda (Ej.: 450nm; 650nm), a fin de determinar la DO de los cromógenos más comúnmente utilizados. Las placas deben leerse lo antes posible después de agregar la solución de parada (stop).

Los controles negativos y positivos deben procesarse junto con las muestras desconocidas para validar el ensayo. Los controles negativos permitirán verificar los resultados falsos positivos causados por unión no específica o contaminación, mientras que los controles positivos confirman que la prueba funciona según lo previsto, incluso si todas las muestras desconocidas son negativas.

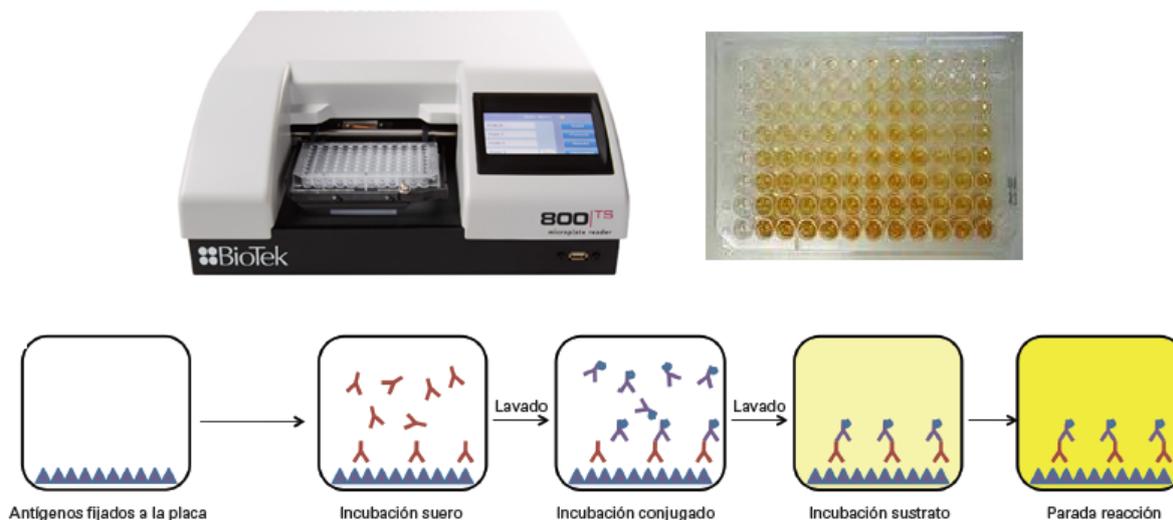


Figura 9. Lector de placa de ELISA. Los Ac de la muestra reaccionan con el Ag unido a la superficie de poliestireno. Las Igs no unidas son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior, se añade anti IgG humana marcada con peroxidasa (HRP). El conjugado sin unir se elimina por un paso de lavado. A continuación, la enzima HRP de la fracción ligada reacciona con el sustrato ( $H_2O_2$ ) y el sustrato de TMB, generándose un producto de reacción (sustrato reducido) que confiere color azul a la solución. Tras la adición de la solución de parada ( $H_2SO_4$ , 1M) el color azul vira a amarillo, debiendo leerse a longitud de onda de 450/620nm. (Modificado de <https://ediciones.grupoaran.com/upload/books/muestras/libros/LIBTSLAB07.pdf>).

Las DO de los blancos y controles debe cumplir con valores pre-establecidos por el fabricante. En caso contrario se desechará la prueba. Se recomienda ejecutar los estándares, los controles y las muestras por duplicado o triplicado.

La curva estándar de un ELISA da origen a una curva sigmoideal en forma de S, que requiere un tipo de modelado matemático (regresión logística), que permite el ajuste de la curva más allá del rango lineal. El ajuste adecuado en la mayoría de los casos lo provee el modelo de regresión de 4 parámetros (4 PL) (Fig. 10) o a lo sumo de 5 parámetros, si la distribución de las DO de los calibradores sugiere que no hay simetría. A partir de la curva estándar ajustada, puede determinarse el valor de las muestras desconocidas.

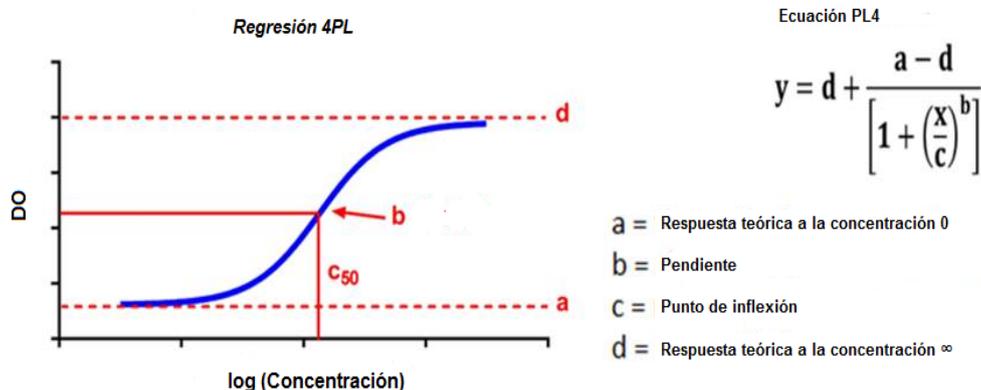


Figura 10. Análisis de regresión no lineal (4 PL) (<https://www.biologend.com/en-us/blog/curve-fitting-for-immunoassays-legendplex>).

Se pueden obtener 3 tipos de salida de datos en los ELISA:

- Cualitativos: los resultados se interpretarán como positivos o negativos en comparación con los pocillos en blanco y/o negativos (no existe una curva estándar) (Ej.: identificación de Ac contra VIH y Ag p24 = ELISA 4<sup>ta</sup> generación).
- Semicuantitativo: la inclusión de soluciones estándar, a menudo positivas altas, medias y bajas, facilita la comparación relativa de niveles entre los pocillos de muestras desconocidas (Ej.: determinación de Ac frente a *Mycoplasma pneumoniae* de clase IgG).
- Cuantitativo: Mediante el uso de varios sueros de referencia de concentración conocida (calibradores), se puede generar una curva dosis-respuesta a partir de la cual se determina la concentración de analito presente en la muestra (Fig. 11).

Ejemplo

### CÁLCULOS

1. Calcular la DO promedio de cada calibrador, control y muestra.
2. La DO de los estándares (eje-y, lineal) se plotean contra su concentración (eje-x, logarítmico) ya sea en papel semi-logarítmico o empleando un software. Se logra un buen ajuste con cubic spline, 4 Parameter Logistics o Logit-Log.
3. La concentración de las muestras se puede leer directamente de la curva estándar. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse, según especificaciones del fabricante. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución aplicado.

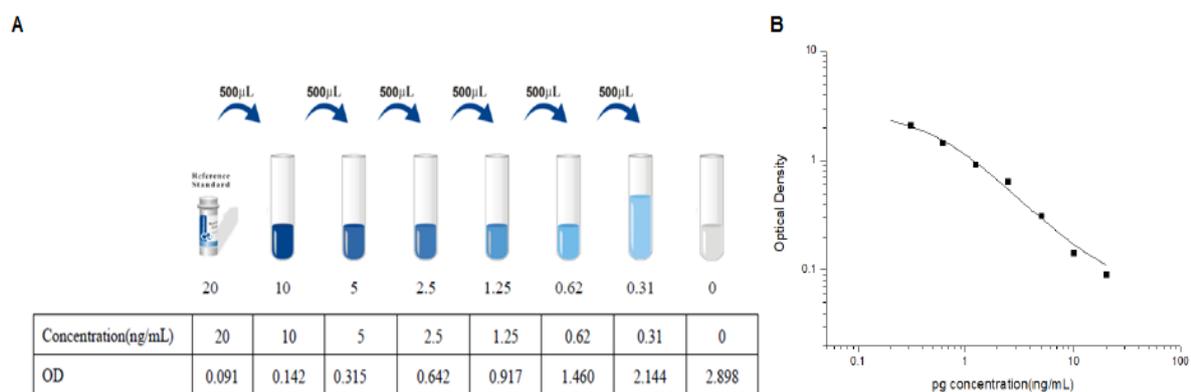


Figura 11. ELISA competitivo para la determinación de progesterona. A) Elaboración de la curva de calibración. B) Curva dosis-respuesta (Catálogo No: E-EL-0154; [www.elabscience.com](http://www.elabscience.com)).

El propósito más importante de la trazabilidad metrológica es que los resultados de una medición obtenidos por un procedimiento de medida rutinario, sean equivalentes a los obtenidos en caso de que las muestras de pacientes fueran medidas empleando un procedimiento de medida de referencia.

Para todo IE, el fabricante debe garantizar la trazabilidad metrológica de los calibradores empleados. Muchas veces estos materiales no sólo son heterogéneos en cuanto a su composición, sino que están insuficientemente caracterizados en los certificados de análisis que acompañan los kits comerciales.

## REACCIONES DE LUMINISCENCIA

El proceso de emisión de radiación como consecuencia de la desactivación de una molécula al pasar de un estado electrónicamente excitado a un estado de reposo se denomina genéricamente luminiscencia.

Existen diferentes formas de luminiscencia:

- *Bioluminiscencia*: es la propiedad de ciertos organismos (insectos, algas, etc.) de producir luz a partir de reacciones enzimáticas específicas.
- *Fluorescencia*: una fuente externa de radiación electromagnética (luz de excitación) es la que transfiere la molécula fluorescente de su estado basal (A) a un estado excitado (A<sup>\*</sup>).
- *Quimioluminiscencia (QL)*: es un fenómeno análogo a la fluorescencia, excepto en el hecho de que la energía de excitación proviene de una reacción química.

Por tanto, para la producción de luz, los compuestos quimioluminiscentes son destruidos en el proceso, mientras que los fluorescentes no, pudiendo repetirse la medida de su fluorescencia (Fig. 12). La instrumentación empleada en la medida de la luminiscencia es similar a la utilizada en las medidas de absorción de ultravioleta-visible.

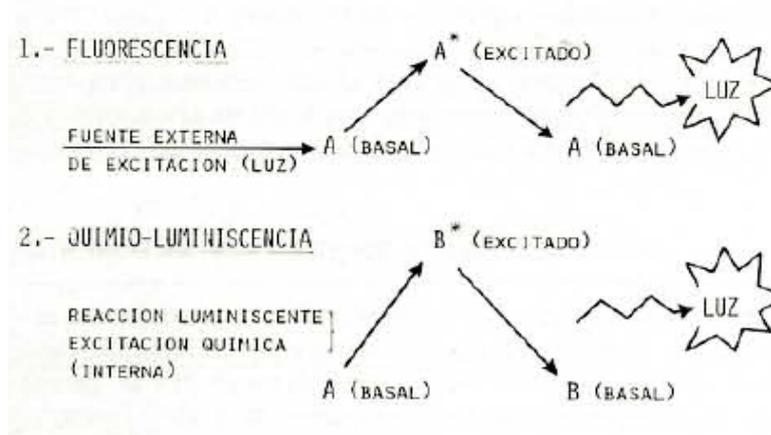


Figura 12. Diferencias entre fluorescencia y quimioluminiscencia (Química Clínica 1987; 6 (I) 31).

### Inmunoanálisis Quimioluminiscentes

La **Quimioluminiscencia (QL)** se produce mediante la generación de especies electrónicamente excitadas en el transcurso de diversas reacciones químicas que, en general, implican oxidación. Ocurre cuando uno de los productos intermedios o finales de una reacción es quimioluminiscente y, por tanto, emite radiaciones electromagnéticas al desactivarse, pasando de un estado excitado a un estado fundamental. La intensidad de emisión de radiación depende de la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción quimioluminiscente.

Aunque distintos autoanalizadores en el mercado se basan en la tecnología quimioluminiscente, el tipo específico de marca varía y a menudo está patentada, y por ello la performance de los ensayos puede variar (Fig. 13). Los IE quimioluminiscentes ofrecen una de las mejores soluciones para la cuantificación de bajas concentraciones de analitos específicos de una mezcla compleja para la industria del diagnóstico *in vitro*.

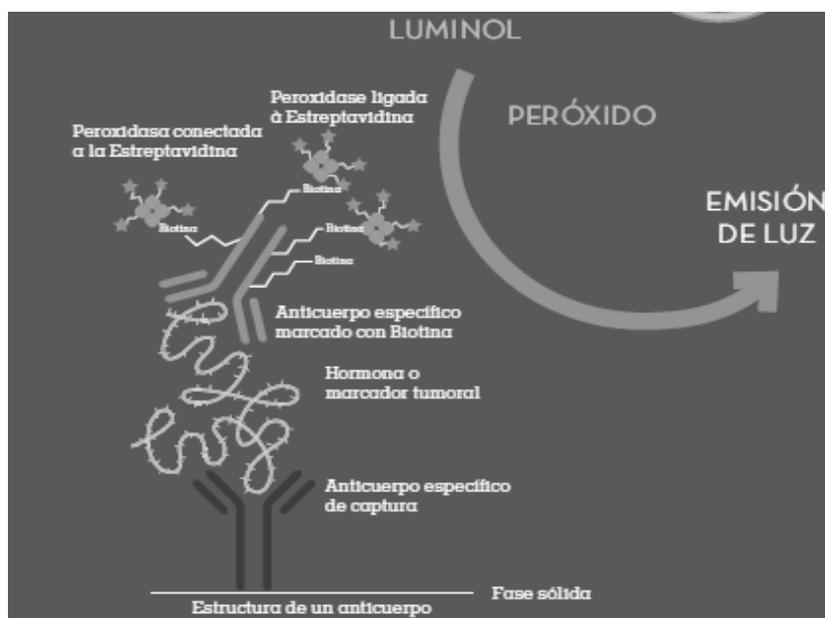


Figura 13. Fundamento de la Quimioluminiscencia (QL). Se emplea una en Ac específico de captura contra la sustancia a analizar (unido a una fase sólida) y, como marca, la enzima fosfatasa alcalina. La reacción quimioluminiscente detectada por el instrumento se desencadena por la adición de peróxido y luminol. La señal emitida es proporcional a la concentración de la sustancia presente en la muestra (Catálogo Línea LumiQuest®-Labtest).

En general, una reacción QL puede formarse por dos mecanismos básicos (Fig. 14):

- **Reacción directa:** se parte de dos reactivos -A y B-, un sustrato y un oxidante ( $H_2O_2$ ,  $KMnO_4$ ,  $Fe(CN)_6^{3-}$ ,  $Ce(IV)$ , N-bromosuccinimida-NBS). A y B reaccionan dando un intermedio de reacción en un estado electrónicamente excitado, que al relajarse hasta el estado fundamental, emite un fotón. A veces, en estas reacciones, se requiere un catalizador que disminuya la energía de activación y aumente el rendimiento cuántico.

En este diseño es común el empleo de ésteres de acridinio conjugados directamente con el Ac para generar una señal.

- **Reacción indirecta** (sensibilizada o de transferencia de energía): el mecanismo es el mismo para la formación del intermedio electrónicamente excitado, pero este intermedio no puede emitir directamente el fotón para dar la QL y requiere la presencia de un fluoróforo al cual le transfiere la energía, de forma que el fluoróforo se excita y al volver a su estado fundamental emite un fotón.

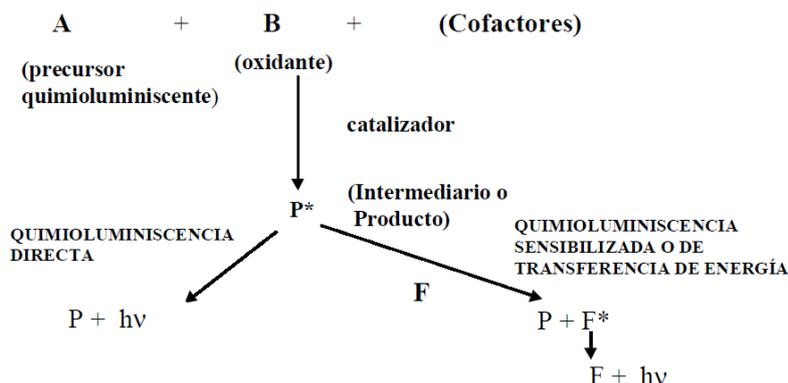


Figura 14. Tipos de reacciones en quimioluminiscencia. P: producto; F: sustancia fluorescente (Ars Pharmaceutica, 42:1; 81-107, 2001).

#### Marcadores quimioluminiscentes

- El **luminol** (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona) y sus derivados. Es uno de los reactivos quimioluminiscentes más empleado en fase líquida. El luminol se oxida cuantitativamente a 3-aminofталato en medio básico tanto en disolventes polares como apolares. La reacción requiere de un oxidante fuerte (el más utilizado es el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y es catalizada por iones metálicos o metacomplejos (Fig. 15).
- Los **ésteres de acridinio** (o acridina) reaccionan con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en medio alcalino y en ausencia de catalizadores dando lugar a N-metilacridona en estado excitado que emite luz a 440nm. Se emplea mucho para marcar proteínas en inmunoanálisis. La lucigenina, nitrato de bis-N-acridinio, no posee el grupo éster, pero sigue el mismo mecanismo que los ésteres, con la única diferencia que requiere de la presencia de iones metálicos de transición que actúan como catalizadores.
- La reacción quimioluminiscente de los **peroxioxalatos** (PO-QL) representa el sistema más utilizado en QL indirecta. En estas reacciones, un éster aril oxalato es oxidado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de un fluoróforo. Se origina un intermedio de elevada energía (1,2-dioxoetanodiona) que forma un complejo de transferencia de carga con el fluoróforo. Éste cede un electrón al intermedio y el complejo se disocia, alcanzando el fluoróforo

un estado excitado; la emisión se produce al volver el fluoróforo al estado fundamental. Puede añadirse a la reacción una base débil como trietilamina o imidazol, como catalizador, para aumentar la intensidad de quimioluminiscencia.

- Tris (2,2'-bipiridina) rutenio (III): otro sistema quimioluminiscente frecuentemente usado es el del complejo  $Ru(bpy)_3^{2+}$ , cuyo estado excitado  $[Ru(bpy)_3^{2+}]^*$  produce una emisión naranja a 610 nm.

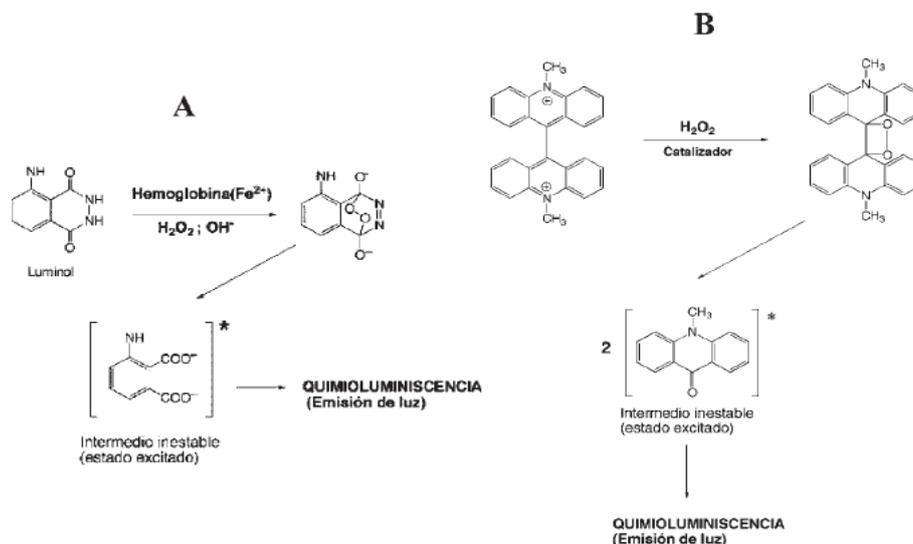


Figura 15. A) Reacción quimioluminiscente del luminol y B) Reacción quimioluminiscente de los derivados de N-metil-acridinio (<https://core.ac.uk/download/pdf/230316185.pdf>).

### Inmunoanálisis de micropartículas quimioluminiscentes (CMIA)

La tecnología de inmunoanálisis de micropartículas quimioluminiscentes (CMIA) se usa para detectar la presencia de Ag o Ac en las muestras. Pueden ser ensayos competitivos o no competitivos. En el caso de Abbott ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Estados Unidos), la marca es un derivado de acridina patentado. Esta marca produce una alta emisión de luz, y por consiguiente alta sensibilidad.

Si bien las técnicas de MEIA y CMIA usan micropartículas para fijar Ac, la marca, la etapa de separación y la tecnología de medición difiere entre estas dos técnicas (Tabla 4):

Tabla 4. Comparación de los pasos en las técnicas MEIA y CMIA (Introducción a los Inmunoensayos. Abbott División Diagnóstico).

Tecnología	Fase Sólida	Etapas de separación	Marca	Tecnología de Detección
MEIA	Micropartícula de Látex	Matriz de Fibra de Vidrio	Enzima Fosfatasa Alcalina	Detector de Fluorescencia
CMIA	Micropartícula Magnética	Imán	Compuesto Quimioluminiscente	Fotomultiplicador de Quimioluminiscencia

Los agentes reactivos necesarios para la tecnología CMIA son:

- Micropartículas paramagnéticas recubiertas de una molécula de captura (Ag, Ac, virus) específica para el analito que se desea medir.
- Conjugado marcado con acridinio.
- Solución preactivadora y solución activadora.

Los principios básicos de la reacción son:

- 1) Cubeta de reacción: el brazo de pipeteo de reactivos dispensa en la muestra micropartículas paramagnéticas (PMP) recubiertas con moléculas de captura. El agitador mezcla la reacción.
- 2) Incubación. El analito presente en la muestra se une a las moléculas de captura de las micropartículas formando un inmunocomplejo.
- 3) Un imán atrae las PMP unidas al analito específico hacia la pared interna de la cubeta de reacción.
- 4) El cabezal de la zona de lavado lava la mezcla de reacción para eliminar materiales no unidos.
- 5) El brazo de pipeteo de reactivos dispensa el conjugado marcado con acridinio. El conjugado se une al inmunocomplejo completando la mezcla de reacción. Incubación.
- 6) Lavado.
- 7) La boquilla preactivadora dispensa la solución preactivadora (solución de  $H_2O_2$ ) y el sistema óptico CMIA realiza una lectura de fondo.

La solución preactivadora lleva a cabo las funciones siguientes:

- Crear un medio ácido para evitar la pérdida prematura de energía (emisión de luz).
- Evitar la aglutinación de las micropartículas.
- Separar el éster de acridinio del complejo micropartícula-conjugado.

8) La boquilla dispensa la solución activadora (solución de hidróxido de sodio) a la mezcla de reacción. El acridinio experimenta una reacción de oxidación al ponerse en contacto con el  $H_2O_2$  en solución alcalina, lo que provoca la reacción quimioluminiscente. Se forma N-metilacridona, liberando energía (emisión luminosa) al volver a su estado basal.

9) El sistema óptico CMIA mide la emisión quimioluminiscente (lectura activada) durante un período de tiempo predefinido, ya sea para cuantificar la concentración del analito o para detectar cualitativamente dicho analito en los ensayos.

## Electroquimioluminiscencia

La electroquimioluminiscencia (EQL) es una metodología cuantitativa para la medición de Ag o Ac basada en el cambio en la señal electroquimioluminiscente antes y después de la inmunorreacción. Se trata de un proceso mediante el cual las especies generadas en el electrodo experimentan una reacción de transferencia de electrones de alta energía para formar estados excitados que emiten luz. Al igual que QL, la EQL no requiere el uso de fuentes de luz externas.

Sin embargo, es preciso distinguir EQL de QL; si bien ambos involucran la producción de luz por especies que sufren reacciones de transferencia de carga altamente energéticas, en la QL la luminiscencia es iniciada y controlada por la mezcla de reactivos y la cuidadosa manipulación del flujo mientras que en la EQL la luminiscencia es iniciada y controlada por la aplicación de un voltaje en un electrodo.

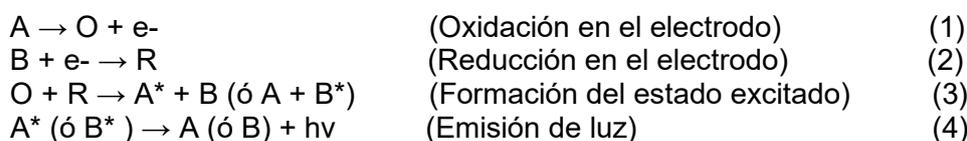
La EQL posee varias ventajas sobre QL, entre ellas:

- La reacción electroquímica permite controlar el tiempo y la posición de la reacción de emisión de luz. Al controlar el tiempo, la emisión de luz se puede retrasar hasta que se produzca la reacción inmunológica o enzimática. El control sobre la posición se puede utilizar para confinar la emisión de luz a una región precisa con respecto al detector, mejorando la sensibilidad al aumentar la relación señal/ruido.
- Puede ser más selectiva porque la generación de estados excitados en EQL puede controlarse específicamente variando los potenciales de electrodo.
- Puede ser más sensible porque algunos reactivos se regeneran electroquímicamente en el electrodo y dar lugar a un proceso de amplificación del ciclo redox.

## Principios de la medición por electroquimioluminiscencia

Como se señala en la Fig. 16, el mecanismo de EQL se puede dividir en dos vías, la vía de aniquilación y la vía de los correactantes. En la vía de aniquilación, sólo se necesita un único emisor para generar EQL, mientras que en la vía del correactante, tanto el emisor como el correactante están involucrados. Un correactante es una especie que luego de oxidarse o reducirse en la superficie del electrodo, produce por etapa química un intermediario que puede reaccionar con un luminóforo electroquimioluminiscente para generar una especie excitada.

Un mecanismo general de aniquilación es el siguiente:



El potencial del electrodo de trabajo oscila rápidamente entre dos valores diferentes para generar la especie oxidada, O, y reducida, R, (Ecuación 1 y 2, respectivamente, donde O y R podrían eventualmente representar especies radicalarias), que reaccionarán en las proximidades de la superficie del electrodo para formar el estado emisor (Ecuación 3).

Las reacciones de aniquilación pueden ser sistemas de energía suficiente o sistemas de energía insuficiente. A las primeras se les llama también de ruta S, y a las segundas de ruta T. En las reacciones de ruta S, EQL se produce partiendo de un mismo precursor, y en las de ruta T de dos precursores diferentes.

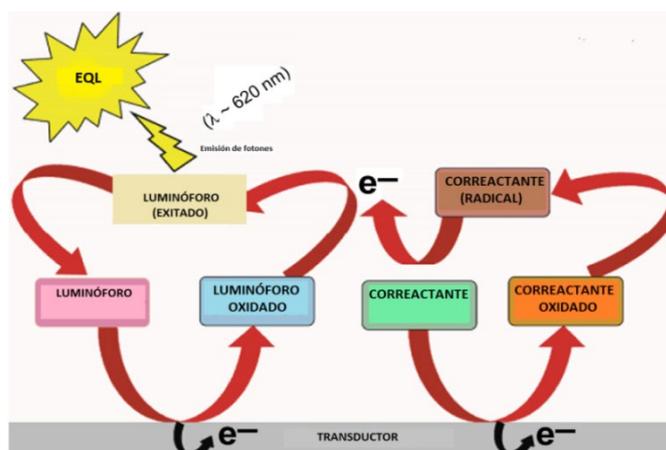


Figura 16. Electroquimioluminiscencia: ilustración esquemática del proceso de emisión de luz en la superficie del electrodo (Rizwan et al., 2018).

El desarrollo de los ensayos de EQL se basa en el uso de dos sustancias electroquímicamente activas, el complejo de rutenio [tris(bipiridil)-rutenio<sup>2+</sup>] y la tripropilamina (TPA), en la superficie de un electrodo de platino. La aplicación de voltaje crea un campo eléctrico que provoca que reaccionen todos los materiales presentes en el mismo, aconteciendo la siguiente serie de eventos (Fig. 17):

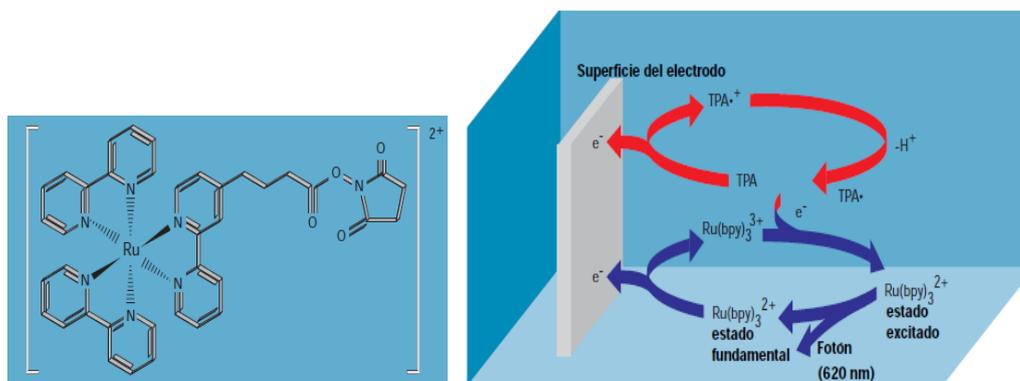


Figura 17. Complejo de Rutenio (II). Reacción de electroquimioluminiscencia que involucra tris(bipiridil)-rutenio<sup>2+</sup> y la tripropilamina (TPA) en la superficie del electrodo de platino (Inserto Cobas e411, Roche Diagnostics).

- La TPA se oxida, libera un electrón y forma un radical-catión de TPA intermedio que a su vez reacciona liberando un protón ( $H^+$ ) para formar un radical de TPA (TPAo).
- A su vez, el complejo de rutenio también libera un electrón en la superficie del electrodo, oxidándose para formar el catión  $Ru(bpy)_3^{3+}$ . Este catión de rutenio es el segundo componente, junto con el radical de TPA, de la reacción quimioluminiscente.
- El radical TPAo y el catión  $Ru(bpy)_3^{3+}$  reaccionan entre sí, con lo que  $Ru(bpy)_3^{3+}$  se reduce a  $Ru(bpy)_3^{2+}$  pasando al mismo tiempo a un estado excitado mediante la transferencia de energía.
- Este estado excitado es inestable y decae con la emisión de un fotón de 620 nm (naranja) hasta el estado original.

Si bien la TPA se consume durante la medición, el complejo de rutenio en estado fundamental se regenera continuamente. Eso significa que puede participar en muchos ciclos generadores de luz durante el proceso de medición, lo cual ejerce un efecto amplificador inherente que contribuye a la sensibilidad de la tecnología.

Los equipos comerciales pueden emplear diferentes diseños de ensayo en función del analito que se desea determinar. Así, por ejemplo, los principios de test disponibles en el analizador Cobas e 411 (electroquimioluminiscencia) son tres (Fig. 18):

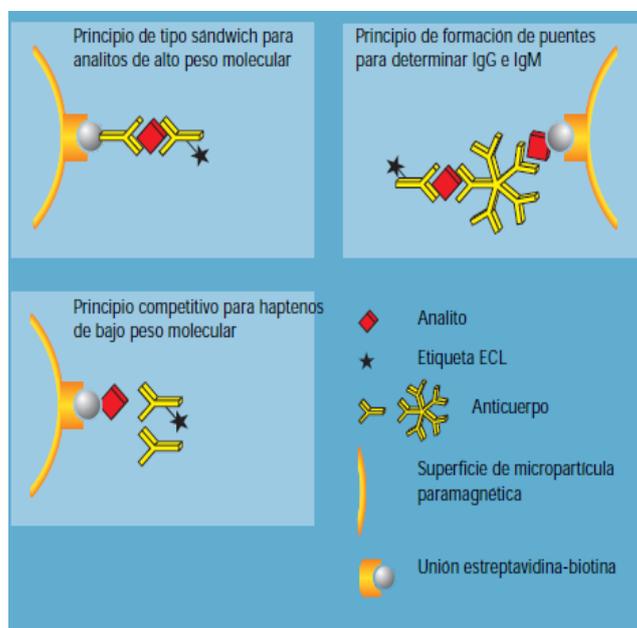


Figura 18. Principios de ensayo electroquimioluminiscencia (Inserto Cobas, Roche Diagnostics).

- Principio **competitivo** para analitos de bajo peso molecular (Ej.: T3 libre)
- Principio de **tipo sándwich** (uno o dos pasos) para analitos de alto peso molecular (TSH).

- Principio de **formación de puentes** (Ej.: IgG, IgM, IgA). El principio de formación de puentes es similar al principio de tipo sándwich, con la diferencia de que el ensayo está diseñado para detectar Ac y no Ag. Esto se logra incluyendo Ag biotinilados y marcados con rutenio en los reactivos por los que el anticuerpo que se presente analizar presenta afinidad.

Ejemplo del desarrollo de un ensayo de EQL tipo sándwich para TSH:

- 1) En el primer paso, la muestra del paciente se combina en una cubeta de ensayo con un reactivo que contiene Ac de la TSH biotinilado y un Ac específico para TSH marcado con rutenio. Durante un paso de incubación los Ac capturan la TSH presente en la muestra.
- 2) En el segundo paso, se añaden micropartículas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina. Durante la incubación, el Ac biotinilado se adhiere a la superficie recubierta de estreptavidina de las micropartículas.
- 3) La mezcla de reacción que contiene los complejos inmunes se transporta hasta la célula de medición; los complejos inmunes quedan atrapados magnéticamente sobre el electrodo, mientras que el reactivo y la muestra libres se eliminan con la solución de limpieza.
- 4) En la reacción de EQL, el conjugado es un derivado basado en rutenio y la reacción quimioluminiscente se estimula eléctricamente para producir luz. La cantidad de luz producida es directamente proporcional a la cantidad de TSH presente en la muestra.
- 5) La evaluación y el cálculo de la concentración del Ag o analito se realiza mediante una curva de calibración a partir de estándares con concentraciones de Ag conocidas (Fig. 19).

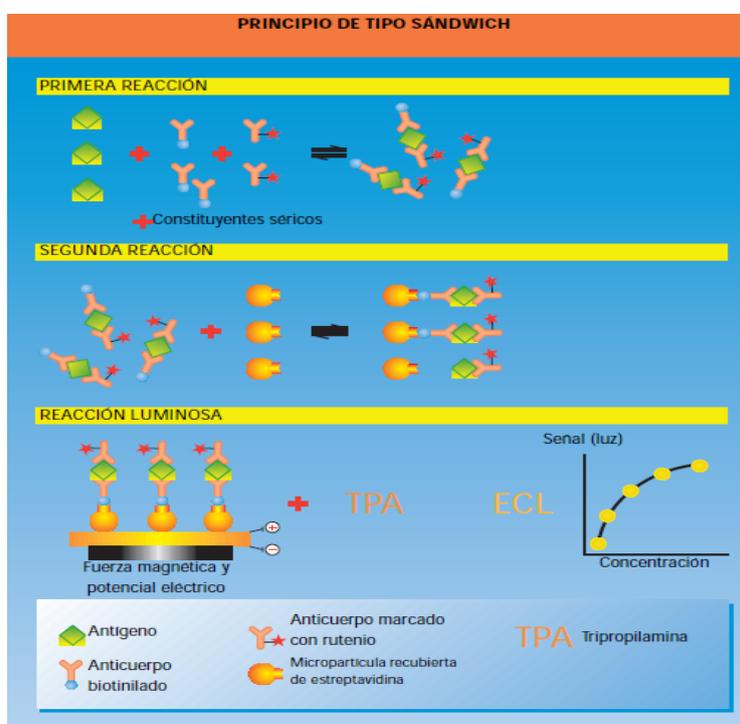


Figura 19. Electroquimioluminiscencia: principio de tipo sándwich (Inserto Cobas e411, Roche Diagnostics).

### **Sistemas de amplificación de la señal: BIOTINA-AVIDINA (ESTREPTAVIDINA)**

La biotina y la avidina son moléculas con una alta capacidad de agregación, llegando a formar grandes polímeros. Por esta razón, el sistema de interacción específica biotina-avidina o estreptavidina es empleado en varias plataformas analíticas para la cuantificación de diversos analitos y biomarcadores.

Mientras que la avidina es una glicoproteína tetramérica natural que se encuentra en la albúmina del huevo y en los tejidos aviares, la biotina (vitamina B7), actúa como coenzima de carboxilasas esenciales en diferentes rutas metabólicas del ciclo del ácido tricarboxílico, la gluconeogénesis y el metabolismo de la leucina. La estreptavidina es un homólogo de la avidina derivado de la bacteria *Streptomyces avidinii* que, al igual que la avidina, se une a cuatro moléculas de biotina con una constante de disociación similar, y es resistente a los cambios de pH, a la degradación enzimática y a los agentes químicos desnaturizantes.

La unión específica y de alta afinidad entre la biotina y la avidina y/o estreptavidina ( $K_d \approx 10^{-14}M$ ) da lugar a sistemas de detección de alta sensibilidad, con bajas señales de fondo inespecíficas. Las Ig purificadas pueden reaccionar con derivados de la biotina, aportando sitios para la unión de varios equivalentes molares de avidina. El acople covalente de la biotina a las proteínas se realiza a través de un enlace amida entre su cadena lateral de ácido valérico (grupo carboxilo) y los grupos  $\epsilon$ -amino libres (ej. de las lisinas) de las proteínas. Estos sistemas se asocian a enzimas marcadoras como HRP o la FA que permiten el revelado de la prueba.

En general, la unión estreptavidina-biotina se utiliza durante la incubación del ensayo para fijar los Ac biotinilados (inmunoensayos en sándwich) o los Ag biotinilados (inmunoensayos competitivos) a superficies recubiertas de estreptavidina (Fig. 20).

#### **Interferentes**

La ingesta de dosis altas de biotina (Ej.: suplementos vitamínicos) puede interferir en los resultados de aquellos IE que utilizan el sistema biotina-estreptavidina entre sus componentes. La interferencia puede ser positiva o negativa según el diseño del ensayo. Así, los inmunoanálisis no competitivos o tipo sándwich (como los diseñados para la determinación de TSH) suelen afectarse mostrando resultados falsamente disminuidos, mientras que en los competitivos (determinación de T4L, T3L y TSHR-Ab) el exceso de biotina compite con el análogo biotinilado por los sitios de unión de la estreptavidina, generando resultados falsamente elevados (Fig. 21).

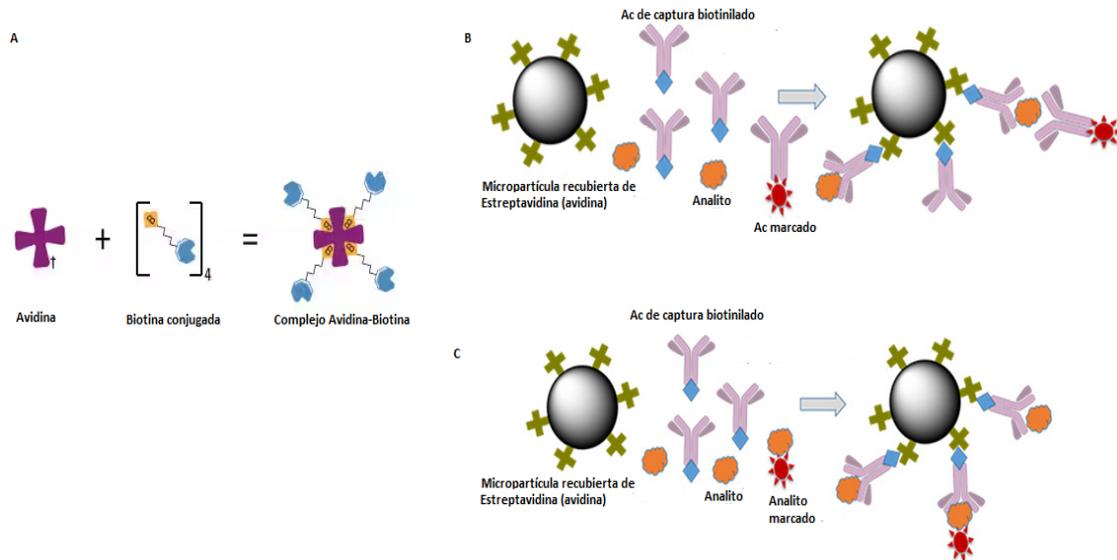


Figura 20. A) Representación esquemática de la interacción avidina o estreptavidina-biotina. Las proteínas avidina o estreptavidina pueden unir hasta cuatro moléculas de biotina, la cual se conjuga con una enzima, un Ac o una proteína diana para formar el complejo avidina-biotina. B) El Ac de captura para un analito diana se bioconjuga con biotina. La unión específica entre biotina-streptavidina conduce a la formación de un complejo terciario. El Ac de captura marcado se une al analito fijado al primer Ac. C) Para analitos pequeños se requiere un ensayo competitivo: el analito presente en la muestra como el analito marcado competirán por el sitio de unión del Ac de captura. Si el Ac de captura se conjuga con biotina, unirá micropartículas recubiertas de estreptavidina (avidina), como el formato sándwich descrito en B). *Biotechnology Advances* 2019; 37: 634-41.

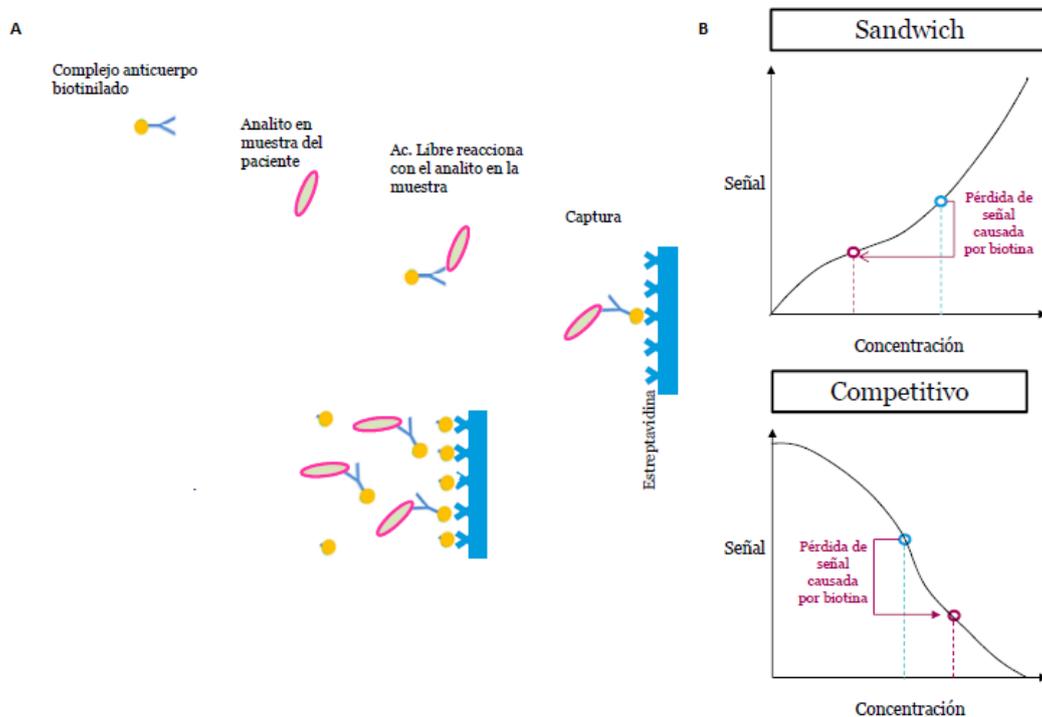


Figura 21. A) Interferencia: la biotina libre inhibe la capacidad de la estreptavidina para capturar el analito de interés en ensayos que utilizan la metodología de libre captura biotinaestreptavidina. B) En general la interferencia de biotina disminuye falsamente los resultados en los ensayos tipo sandwich e incrementa falsamente los resultados en inmunoensayos competitivos que utilizan el formato biotina/estreptavidina. *Abbott, Reunión NAL BS INS, 2018*).

Las variables asociadas a la magnitud de la interferencia de biotina se relacionan con:

- Dosis, régimen y concentración sérica de biotina
- Función renal
- Tipo de metodología del ensayo (competitiva vs. no competitiva)
- Volumen de muestra utilizada
- Diseño: 1 ó 2 etapas / con o sin lavado
- Catabolitos de biotina que también se ligan a estreptavidina (bisnorbiotina, sulfóxido de biotina, etc.)
- Umbral de interferencia del ensayo

Si bien se considera una situación excepcional, cada vez se informan más casos, siendo necesario concienciar al médico clínico de la existencia de interferencias frecuentes y relevantes por consumo de biotina a través de suplementos alimentarios, así como de la necesidad de confrontar los resultados con la clínica antes de iniciar intervenciones o tratamientos innecesarios.

Si el resultado de una prueba de laboratorio no coincide con la presentación clínica del paciente, debería sospecharse la interferencia de biotina como una posible fuente de error.

La presencia de Ac anti estreptavidina (Ac anti-E) es causa muy rara de interferencia en IE. Se presenta en forma similar a la interferencia por biotina, siendo el efecto más pronunciado en los ensayos competitivos (T4L) que en los no competitivos (TSH).

En ensayos competitivos por EQL para T4L, por ejemplo, si el suero del paciente tiene Ac anti-E, estos pueden unirse a la estreptavidina del ensayo, disminuyendo la formación del complejo [Ac marcado con Rutenio-T4-biotina-estreptavidina unida a partículas magnéticas]. Esto deriva en una menor producción de luz, por lo que el equipo informará una concentración sobreestimada de T4L.

Dado que las bacterias del género *Streptomyces avidinii* son muy abundantes en la tierra, donde descomponen y reincorporan la materia orgánica para ser aprovechada por plantas y otros organismos, se ha propuesto que los Ac anti-E pueden encontrarse en individuos que se hallan en contacto con suelos de cultivos, huertas orgánicas, barro o plantas en descomposición donde habita la bacteria. Hasta el momento se desconocen las circunstancias que llevan a la aparición de los Ac anti-E.

### **REACCIONES DE INMUNOPRECIPITACIÓN (en solución)**

Cuando un Ag en solución se combina con un exceso de antisuero específico, la formación de pequeños agregados (inmunoprecipitados) da como resultado la aparición de turbidez en la muestra. Existen dos enfoques para cuantificar esa turbidez (Fig. 22):

- **Turbidimetría:** se basa en la medición de la disminución de intensidad de la luz transmitida. Dicha medición se puede realizar en un espectrofotómetro convencional.

- **Nefelometría:** mide directamente la intensidad de la luz dispersada (*scattered light*). La nefelometría requiere de un nefelómetro, que utiliza un láser helio-neón como fuente de luz. Los detectores se pueden montar en ángulos de 30°, 70° ó 90°.

En ambos casos, las concentraciones del analito se calculan por referencia a una curva de calibración almacenada en el instrumento.

Las mediciones pueden ser de tipo cinético o de punto final: en el caso de la determinación sea cinética, los cambios en la luz dispersada o absorbida se miden a intervalos cortos, mientras que si se trata de un método de punto final, la reacción ocurre durante un período de tiempo definido (p. ej., 15 ó 30 minutos).

La sensibilidad de la metodología se puede aumentar a partir del empleo de partículas recubiertas con el Ag específico. Esto es útil si el Ag está presente en baja concentración, ya que las partículas extienden los inmunocomplejos formados, amplificando la señal.

Los ensayos inmunonefelométricos e inmunturbidimétricos automatizados para la medición de proteínas se han desarrollado y expandido rápidamente en los últimos años, reemplazando progresivamente las tradicionales técnicas de precipitación en gel. Se emplean para la determinación de inmunoglobulinas, cadenas livianas libres, proteínas del complemento, proteínas de fase aguda, proteínas de la coagulación, hemoglobina glicada (HbA1c), entre otras.

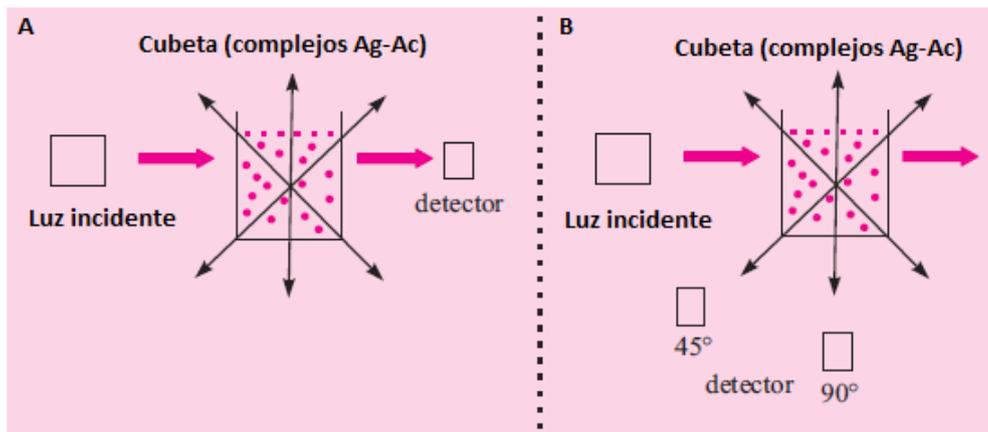


Figura 22. A) Principio de la inmunturbidimetría B) Principio de la inmunonefelometría: los complejos Ag-Ac que se forman al mezclar la muestra (que contiene el Ag) con el correspondiente antisuero dispersan la luz, la cual es detectada mediante una fotocelda a 90° (<http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>)

## PRUEBAS DE LABORATORIO EN EL LUGAR DE ASISTENCIA DEL PACIENTE (POCT)

Las pruebas de laboratorio en el lugar de asistencia al paciente pueden definirse como aquellas magnitudes biológicas que se determinan fuera del laboratorio, en un entorno próximo al lugar de asistencia al paciente, y que son realizadas de forma manual, automática o semiautomática por personal ajeno al mismo. Este tipo de tecnologías se denominan POCT (*Point of Care Testing*).

Las plataformas POCT utilizan diferentes metodologías, dependiendo del analito que se desea determinar (Tabla 5). Existen equipos capaces de realizar lecturas fotométricas, inmunológicas con detección enzimática o fluorométrica y cromatografía.

Aunque no es necesario que los profesionales sanitarios que realizan estas pruebas dispongan de titulación en análisis clínicos, estos deben haber recibido formación y certificación por parte de un profesional de laboratorio, que deberá supervisar esta parte crucial en el proceso de realización de las POCT.

La implantación de estas pruebas sólo tiene sentido cuando sustituyen o complementan con ventajas algunas prestaciones de los laboratorios en beneficio de los pacientes.

Tabla 5. Ejemplos de analitos determinados por POCT (Clin Lab 2018; 64:1-9).

Analito/Especialidad	Material biológico analizado	Tecnología aplicada	Fabricante
Glucosa/Química Clínica	Sangre	Tiras reactivas-Química seca	Abbott
Nitritos/Urianálisis	Orina	Tiras reactivas-Química seca	Roche
Troponina I/Química Clínica	Sangre EDTA	Inmunoensayo fluorométrico (AQT90 Flex)	Radiometer
Protrombina/Hemostasia	Sangre entera capilar	Electroquímica (Coagcheck XS Pro)	Roche
pO <sub>2</sub> , pCO <sub>2</sub> /Gases en sangre-Emergentología	Sangre heparina	ISE: Amperometría y potenciometría	Radiometer
IgG anti H. pylori/Inmunología	Suero	Inmunocromatografía	Acon Lab. Inc.
Estreptococo beta hemolítico /Microbiología	LCR	Agglutinación en látex (BBL Streptocard Acid Latex Test)	Becton, Dickinson

### Ventajas:

- Extensión del servicio del Laboratorio.
- Simplificación de la fase pre-analítica, incluidos procedimientos administrativos, tiempo de transporte de muestra y circuitos hospitalarios.
- Menor volumen de muestra y uso de muestras no centrifugadas.
- Reducción del tiempo necesario para la toma de decisiones clínicas e intervención terapéutica precoz.
- Estratificación rápida de los pacientes en las áreas de atención de urgencia.

#### Limitaciones:

- Inadecuada o nula identificación del paciente.
- Falta de garantía de calidad de los resultados. Posibilidad de inexactitud de las mediciones.
- Sobreutilización o uso inadecuado.
- Operadores con foco clínico, y no de laboratorio.
- Capacidad limitada de almacenamiento de los resultados o falta de transferibilidad de los mismos.
- Falta de supervisión de los instrumentos y falta de conectividad de los POCT al sistema informático del laboratorio.

#### Clasificación de los POCT

Debido a la gran cantidad de pruebas que se pueden realizar en el lugar de asistencia del paciente y la heterogeneidad de las tecnologías, es posible clasificarlo de diferentes maneras. De acuerdo al tipo de método las pruebas pueden ser agrupadas en:

- 1) Métodos Cualitativos y semicuantitativos: por lo general no suelen requerir instrumentación y tan sólo necesitan de la interpretación visual del operador. Ej: tiras reactivas de orina.
- 2) Métodos Cuantitativos: requieren el uso de un analizador que determine o cuantifique al analito. Ej: equipos multiparamétricos para gases y medio interno.

#### Consideraciones generales

Todas las técnicas o métodos analíticos realizados en los POCT deben estar sometidas a un programa de Control de Calidad Interno (CCI). Además, siempre que sea posible deberán estar sometidos a un programa de Evaluación Externa de la Calidad (CCE) o un programa formal de intercomparación. En caso que no se encuentre disponible un programa, una alternativa es desarrollar algún mecanismo que proporcione evidencia objetiva de que los resultados son aceptables (Ej: comparación con los resultados obtenidos en los analizadores del laboratorio central para verificar la intercambiabilidad).

El laboratorio central debe definir los criterios para la verificación de la calibración de los POCT así como establecer un programa de mantenimiento preventivo de todos los instrumentos POCT en uso de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Todos los procedimientos de manejo de muestras, reactivos e insumos para POCT, en cuanto a bioseguridad, deben realizarse de acuerdo con la normativa vigente y bajo las normas desarrolladas por cada institución según su nivel de complejidad. Las tiras reactivas, cartuchos o elementos que contienen muestras biológicas deben ser tratados como material contaminado.

Al usuario del equipo POCT le corresponde validar la información entregada por el equipo, verificando los resultados obtenidos del examen realizado y los datos del paciente, así como también le corresponde llevar el respectivo registro de los resultados en un sistema diseñado por la institución para ello.

Los informes de resultados de los exámenes obtenidos realizados en equipos POCT, tendrán que estar disponibles y recuperables como cualquier informe de laboratorio cumpliendo con los plazos reglamentarios de conservación de resultados.

Distintos organismos internacionales cuentan con sus recomendaciones para la implementación de las pruebas POCT, como el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, el *College of American Pathologists*, la *Joint Commission on the Accreditation of Healthcare Organizations* y la norma ISO 22870: *Point of care testing. Requirements for quality and competence*.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Chen, W., Jie, W.U., Chen, Z.O., Jie, X.U., Huang-Xian, J.U. (2012). Chemiluminescent immunoassay and its applications. *Chin J Anal Chem* 40: 3-10.
- Ferreira, C. (2018). Point-of-Care Testing: General Aspects. *Clin Lab* 64: 1-9.
- Luong, J.H.T. (2019). Biotin interference in immunoassays based on biotin-strept(avidin) chemistry: An emerging threat. *Biotechnol Adv.* 37: 634-641.
- Alhaji, M., Farhana, A. (2021). *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

## CAPÍTULO II AUTOMATIZACIÓN EN QUÍMICA CLÍNICA



### OBJETIVO

- Conocer los principios de automatización aplicados en el laboratorio de bioquímica clínica.

### INTRODUCCIÓN

La aparición de los laboratorios clínicos, es decir los laboratorios instalados en los hospitales y cuya función principal era la ayuda en el diagnóstico de los enfermos, se produjo hace unos 200 años en Inglaterra, Francia y los países de lengua alemana.

El desarrollo del análisis químico y de la química orgánica en la primera mitad del siglo XIX permitió que se aplicaran estas técnicas analíticas a los fluidos biológicos con fines diagnósticos. Se trataba de pruebas rudimentarias y muy laboriosas, cualitativas o semi-cuantitativas, basadas en un cambio de color que se valoraba de forma visual o por medio de colorímetros muy simples. Otras pruebas requerían de técnicas gravimétricas, de titulación o gasométricas.

Durante los primeros años del siglo XX comienzan a establecerse diferentes disciplinas dentro de los laboratorios clínicos, como la hematología, la microbiología y la química clínica. Se describen métodos colorimétricos sensibles para la determinación cuantitativa de analitos de interés en el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades utilizando volúmenes pequeños de sangre y orina. Asimismo, técnicas de separación como la cromatografía, la ultracentrifugación y la electroforesis se aplicaron a los laboratorios clínicos para cuantificación de ciertos analitos. En los años 50 se extiende el uso de los fotómetros de llama para la determinación de sodio y potasio en plasma y orina.

Desde los años 30 a los años 60 se fueron mejorando los métodos analíticos con el objetivo puesto en la reducción del volumen de muestra y en la simplificación y rapidez de las técnicas. En este sentido, cobra importancia el colorímetro fotoeléctrico para cuantificar reacciones químicas; primero se emplearon los fotómetros de filtros y posteriormente los aparatos de doble haz.

En 1950, Levey y Jennings aplicaron por vez primera las gráficas de control que Shewhart había utilizado en la industria a los procedimientos analíticos del laboratorio clínico.

La introducción en 1956 de la tecnología química de las tiras reactivas para los análisis de orina (Glukotest, Clinistix) representó un hito fundamental en los estudios realizados con este fluido biológico.

En 1957 se describe un analizador de flujo continuo para la determinación de urea en suero y un año después la empresa Technicon comercializa el primer analizador automático para química clínica. En 1970 se introdujo el primer analizador discreto *random access* (*DuPont Automated Clinical Chemistry Analyzer*).

Durante la década del ochenta los desarrollos en el campo de la electrónica, la informática y la robótica le dieron un importante impulso a la automatización, y les permitió a los laboratorios clínicos no sólo dar respuesta a un número cada vez más creciente de peticiones analíticas, sino también controlar las etapas de trabajo y conseguir que todas las muestras que se analizaban estuvieran sometidas a las mismas manipulaciones. La producción industrial de reactivos con fines diagnósticos promovió una estandarización de los análisis y garantizó una mejor calidad (Fig. 1).

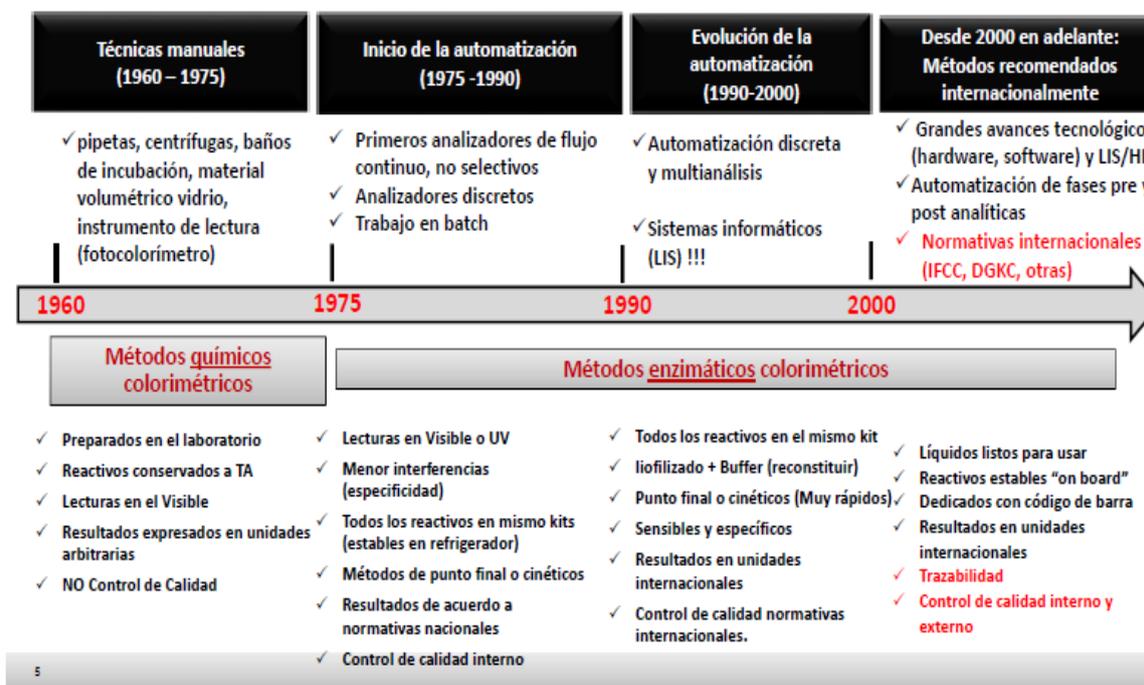


Figura 1. Evolución histórica de los laboratorios de análisis clínicos (Nesprías JM-Wiener Lab).

Otro avance en el campo de los autoanalizadores fue el desarrollo e incorporación de las técnicas de inmunoquímica, que permitió la cuantificación de hormonas, vitaminas, marcadores tumorales, anticuerpos y drogas. Estos instrumentos emplean los principios de la inmunoturbidimetría/nefelometría, inmunoensayos competitivos y no competitivos con detección por quimio/electroquimioluminiscencia, entre otros.

Desde 1995 ha habido grandes cambios en los analizadores automáticos; estos se han vuelto más compactos, rápidos y fáciles de usar como resultado del refinamiento en los avances de software, integración, consolidación y conectividad. La automatización ha avanzado con características de independencia e intervención mínima del operador.

En un esfuerzo por reducir los costos y responder más rápidamente a las necesidades clínicas, los laboratorios han desarrollado un "núcleo" altamente automatizado con instalaciones y pruebas distribuidas en áreas específicas de procesamiento. Con base en la tecnología actual, pruebas que alguna vez se realizaron en secciones de laboratorio separadas ahora se realizan en una sola plataforma (analyzer único), en una celda de trabajo (dos o más instrumentos vinculados), o con el uso de la automatización total del laboratorio (célula de trabajo con procesamiento post-analítico).

El desarrollo de un sistema de preanalítica mejorada en la manipulación de muestras (por ejemplo, códigos de barras, centrifugas automáticas, destapador), el uso de analizadores de alta precisión y actividades post-analíticas (por ejemplo, informes de laboratorio a través de sistemas informáticos en red-LIS) contribuyen aún más a mejorar la calidad de los servicios prestados.

### **Características de la automatización**

Acorde con la definición de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, 1994), se define la automatización en Química como: "El reemplazo del esfuerzo y manipulación manual en el desempeño de ciertos procesos, por instrumentos y mecanismos inventados que son regulados y retroalimentados por información de aparatos automonitoreados y autoajustados".

Así, la **automatización del laboratorio clínico** se caracteriza por la integración del personal de laboratorio y de los sistemas informáticos, analíticos, preanalíticos y postanalíticos para beneficiar positivamente al sistema de salud, al paciente y a la calidad, economía, confiabilidad, velocidad y seguridad del laboratorio.

Entre los principales aportes de la automatización se incluyen la reducción en la variabilidad de los resultados y en los errores analíticos, así como la eliminación de tareas que resultan repetitivas, monótonas y/o riesgosas para el personal de laboratorio. Del mismo modo, disminuyen errores potenciales de procesos manuales relacionados con el pipeteo, el cálculo o la transcripción de resultados. Así, permite la liberación de recurso humano para realizar tareas que requieren mayores conocimientos (Gestión del conocimiento) (Tabla 1).

Como principales inconvenientes o desventajas de la automatización podría citarse:

- Incremento de costos fijos.
- Incremento del mantenimiento.
- Reducción de flexibilidad de recursos.

Tabla 1: Objetivos de la automatización

Automatización
- Mejorar la productividad: procesamiento de un gran volumen de pruebas en menor tiempo.
- Estandarizar procesos y tiempos.
- Reducir errores, especialmente en la etapa analítica: mejora la precisión y exactitud.
- Incrementar los niveles de seguridad para el operador.
- Eficientizar costos y recursos humanos.

En la mejora del proceso productivo derivado de la gestión total de la calidad, se distinguen dos modelos de automatización: el laboratorio totalmente automatizado (LTA) y el laboratorio automatizado modular (LAM).

- El LTA supone la gestión integral de la muestra, ya que se automatiza desde la fase preanalítica hasta la fase postanalítica. TLA es ideal para laboratorios centrales que realizan un amplio espectro de pruebas utilizando sistemas altamente automatizados acoplados con sofisticados sistemas de información de laboratorio (LIS) (Fig. 2).
- En el LAM se crean áreas que, aunque están físicamente separadas, se agrupan por módulos de automatización denominados *workcells* dependiendo del tipo de muestra a analizar. Esta modalidad posee la desventaja de tener que transportar el tubo de un sistema a otro, o alicuotar la muestra en diferentes tubos.



Figura 2. Ejemplo de un sistema de automatización total del laboratorio. Puede incluir equipos de: hematología (con realización y tinción automática de extendidos), hemostasia, química clínica e inmunoensayo, así como la gestión integral de datos del sistemas informático (estación de trabajo, módulos pre- y postanalíticos: inspección de tubos, centrifugación, almacenamiento refrigerado, alicuotado, entrada y salida de racks, selladora, destapadora, etc.). (<http://siemens.com/healthcare>)

Clasificación de la automatización en el laboratorio clínico

La figura 3 esquematiza la clasificación de la automatización del laboratorio clínico definiendo dos componentes principales: automatización analítica y automatización extra-analítica. A su vez, los procesos extra-analíticos se pueden dividir en:

- Procesos extra-analíticos intralaboratorio (preanalíticos).
- Procesos extra-analíticos extralaboratorio (pre-preanalíticos).

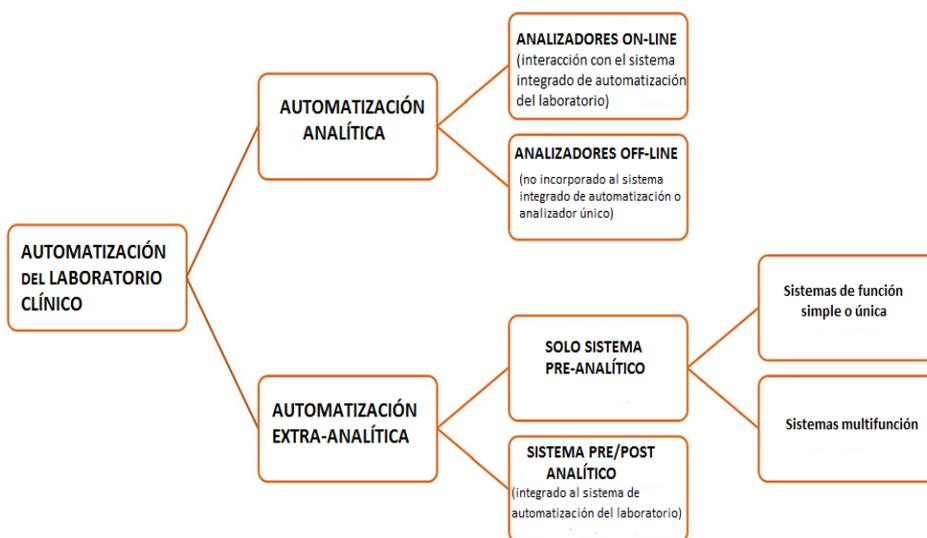


Figura 3. Automatización en el laboratorio clínico (Turk J Biochem 2021; 46: 115-28).

Los procesos preanalíticos involucran el procesamiento de la muestra mientras que los pre-preanalíticos incluyen la solicitud de la prueba, preparación automatizada de contenedores de muestras (selección de aspiradores y etiquetado específico para cada paciente), toma de muestra y transporte (Fig. 4).

Todos los procesos que van desde el orden de la prueba hasta el informe de resultados se asocian con un determinado tiempo de respuesta en la rutina del laboratorio y están interconectados entre sí.

Por otra parte, la etapa postanalítica de la automatización extra-analítica cubre la verificación automática, el reencapsulado, el archivado automático de las muestras, la recuperación, el destapado en el caso de una repetición y la clasificación secundaria de muestras para analizadores fuera de línea.



Figura 4. Estación de trabajo extraanalítica multifunción. El equipo Roche Cobas 612 posee un sistema automatizado de centrifugación, destapado y recapsulado de tubos, realización de alícuotas y etiquetado con código de barras de tubos secundarios, incluida la inspección de la calidad de la muestra para descartar hemólisis, lipemia e ictericia (<http://www.cobas.com>).

## COMPONENTES PRINCIPALES DE UN ANALIZADOR AUTOMÁTICO

Un analizador automático se compone de las siguientes partes (Fig. 5):

- Sistema proporcionador de muestras
- Sistema proporcionador de reactivos
- Sistema de refrigeración de reactivos
- Sistema de dilución y pipeteo (hidráulico)
- Sistema de homogenización de la reacción
- Sistema de incubación
- Sistema de lectura (detectores)
- Sistema de lavado
- Procesamiento de datos: software-microprocesador-Interfase analizador/LIS
- Compartimiento de desechos biológicos

### Términos relacionados

- Tiempo de retardo: tiempo mínimo requerido para obtener el resultado luego del procesamiento inicial de la muestra.
- Capacidad: número máximo de muestras o pruebas que pueden procesarse en una hora.
- Turn Around Time (TAT): tiempo para alcanzar el ciclo total de análisis.
- Pruebas STAT (del latín *statim*: inmediatamente) pueden ser:
  - Urgentes: el instrumento deja de procesar las muestras de rutina y se enfoca en la muestra urgente.

- Emergencias: el instrumento termina de tomar las determinaciones que tiene programadas en la muestra que está analizando y pasa a realizar la muestra emergente.



Figura 5. Partes de un autoanalizador 1) Sonda de muestra; 2) Bandeja de muestras; 3) Carga de muestra; 4) Carga y recogida de racks; 5) Unidad de lavado; 6) Cubeta de reacción; 7) Bandeja de reactivos; 8) Interfaz de usuario y 9) Módulo ISE (electrodo ión selectivo) integrado (ClinicalChemistryAnalyzer/CA-800).

## CLASIFICACIÓN DE ANALIZADORES DE QUÍMICA CLÍNICA

Actualmente existen en el mercado muy diversos tipos de analizadores para Química Clínica y se pueden clasificar de acuerdo a sus características de funcionamiento:

Según el grado de automatización:

- 1) Analizadores SEMI-AUTOMÁTICOS: lectura de absorbancia. Cálculo y expresión de los resultados.
- 2) Analizadores AUTOMÁTICOS: mezcla de muestra y reactivos, incubación, lectura, cálculo y expresión de resultados.

Según el sitio de reacción:

- 1) CONTINUOS: las muestras fluyen a través de una ruta de reacción común y son introducidas en forma secuencial a intervalos de tiempo, una detrás de otra. A cada muestra se le realizan todos los análisis. Dado que el proceso una vez iniciado puede no ser detenido, resulta poco apto para urgencias o análisis únicos. Los reactivos son bombeados en tuberías a través del sistema generando una corriente

de flujo y la muestra es movida empleando bombas peristálticas. Susceptibles al fenómeno de *carry over*.

- 2) DISCRETOS: las muestras son transportadas a través del instrumento en su propio conducto de reacción (contenedores individuales). Los reactivos se adicionan discontinuamente por medio de dispensadores y se utilizan jeringas de desplazamiento de líquido positivo. Procesa múltiples pruebas de a una muestra a la vez o una prueba a la vez para múltiples muestras. La mayoría de los autoanalizadores actuales son discretos y permiten un surtido casi ilimitado de análisis en un solo instrumento, al combinar pruebas rutinarias de química clínica e inmunoensayo.

Según la secuencia de trabajo

- 1) BATCH (lote o tandas): todas las muestras se cargan simultáneamente y se realiza un sólo ensayo en cada muestra.
- 2) RANDOM ACCESS (acceso directo): puede realizarse cualquier ensayo en cualquier muestra y en cualquier secuencia. Las pruebas de especímenes designados (STAT), pueden tener prioridad. Representa la configuración de acceso más común de los analizadores en la actualidad (Fig. 6).

Según tipo de metodología (principio de medición):

- 1) QUÍMICA LÍQUIDA: reactivos líquidos listos para usar o liofilizados más buffer (la reacción ocurre en fase líquida).
- 2) QUÍMICA SECA: tecnología mediante *slides* (Tecnología VITROS, *Ortho Clinical Diagnostics*). Reactivos listos para su uso en forma liofilizada. Se reconstituyen con la humedad de la muestra. Los sistemas pueden trabajar por lote por perfiles o por urgencias.

Según configuración del analizador:

- 1) Analizadores CERRADOS: solo pueden ser utilizados con reactivos de su marca, no admite cambio de parámetros ni programación de técnicas diferentes a las del proveedor.
- 2) Analizadores ABIERTOS: los parámetros de ensayos analíticos pueden ser modificados por el operador y permite la incorporación de técnicas/reactivos de diferentes proveedores. Los laboratorios necesitan realizar la validación del método para cada ensayo que adaptan a un sistema abierto.



Figura 6. Analizador de Química Clínica Cobas e311 de acceso aleatorio (*random access analysis*) y configuraciones de prioridad STAT flexibles (Roche Diagnostics).

Los grupos de pruebas a realizar son definidos para una muestra ya sea manualmente por el operador en la pantalla o utilizando el teclado, mediante un sistema de información del laboratorio en conjunto con un lector de códigos de barra, o bien a través de la selección apropiada del *pack* de reactivos.

### **OPERACIONES EN EL PROCESO ANALÍTICO**

Un componente clave de cualquier estación de trabajo es el equipo. Al realizar una auditoría de instrumentos, uno puede entender mejor cómo se utiliza cada analizador, sus costos asociados y las chances potenciales que podrían existir para mejorar el rendimiento. Las características de funcionamiento de cada instrumento deben ser detalladas como parte de este proceso. Los ejemplos incluyen el máximo número de muestras que se pueden procesar por hora, el número de muestras que se pueden cargar a la vez, y el número de contenedores de reactivos y ensayos que se pueden almacenar a bordo. La mayoría de los analizadores químicos son sistemas basados en pruebas, es decir, realizan un número específico de pruebas por hora, independientemente de cuántas pruebas estén solicitadas en cada muestra.

### **Toma de muestra de sangre venosa**

Han sido desarrollados distintos sistemas automatizados de muestreo venoso (Fig. 7). Son menos dolorosos que el procedimiento estándar debido a que aplican un anestésico tópico activado por ultrasonido. La aguja está oculta a la vista del paciente y su colocación

es rápida y estable, sin provocar temblores e inducir movimientos no deseados (por ejemplo, durante el cambio de tubo en los sistemas de vacío). Además, son más seguros para el operador debido a que se evita el contacto con agujas y otros elementos punzocortantes.

Existen también dispositivos generadores de imágenes digitales en tiempo real que permiten la localización de las venas del antebrazo (Fig. 7). El sistema permite visualizar venas superficiales subyacentes, bifurcaciones y válvulas intraluminales, a menudo invisibles a simple vista.

Las herramientas mencionadas buscan incrementar la seguridad tanto del paciente como del personal sanitario, prevenir la hemólisis de las muestras, disminuir los tiempos de respuesta y contribuir a incrementar la calidad de pruebas.

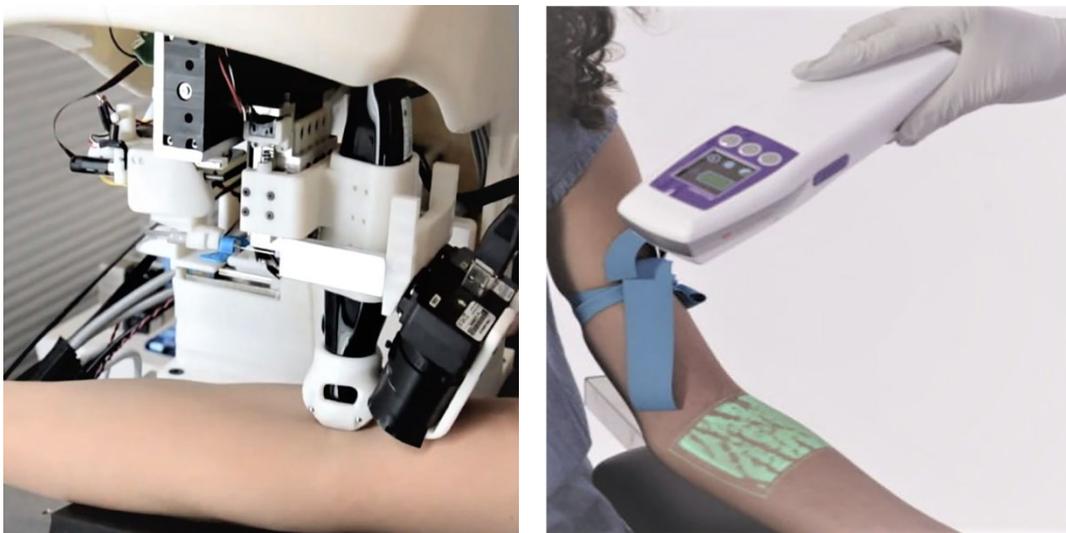


Figura 7. A) Sistema automatizado de muestreo venoso (VenousPlus, Vasculogic); B) Dispositivo visualizador de venas en tiempo real: la hemoglobina de la sangre absorbe luz infrarroja, lo que permite que las venas se distingan claramente. Esto contribuye a su localización exitosa en procedimientos de extracción de sangre o canalizaciones (Accuvein av500, Accuvein) (Turk J Biochem 2021; 46: 115-28).

### Identificación de la muestra

El proceso de identificación comienza desde la obtención de la muestra y debe mantenerse durante el transporte, procesamiento e informe de resultados. La identificación automática consiste en tecnologías que electrónicamente detectan una característica o un dato asociado a una muestra, por ejemplo número de paciente. El **código de barras** se ha transformado en la tecnología de elección en el laboratorio clínico para la identificación automática de muestras (Fig. 8).

Junto con el etiquetado, se cargan las determinaciones a realizar a un sistema informático que genera un registro, el cual permanece incompleto hasta que se introduzcan los resultados correspondientes. Si se realiza el etiquetado con código de barras, éste se lee

con un lector de códigos, y se le asignan las pruebas a realizar desde la computadora. Hay procesos que requieren un segundo etiquetado, y son aquellos en los que se debe extraer muestra y alicuotar desde el tubo original para distribuirla a los distintos sitios donde se llevan a cabo los procesos analíticos. Algunos equipos realizan este proceso también automáticamente, siendo necesario sólo introducir el tubo de origen.



Figura 8. Lectura de tubo identificado con código de barras.

Si el laboratorio no cuenta con un sistema de código de barras para el etiquetado, este se realiza de forma manual y debe ser introducido en el programa computacional con las determinaciones correspondientes a través de un operador.

La utilización de códigos de barra para el etiquetado tiene ventajas como:

- ✓ Eliminación de las listas de trabajo del sistema.
- ✓ Disminución de los errores de transcripción.
- ✓ Evitar los errores de colocación de tubos en el analizador y durante el muestreo.
- ✓ Análisis de muestras en secuencias al azar.
- ✓ Evita la mezcla de sueros cuando debe ser transferido a un contenedor secundario.

Los errores en la etapa de identificación son graves, ya que pueden llevar a atribuir resultados al paciente equivocado.

### **Transporte de la muestra**

Se usan múltiples métodos para transportar las muestras al laboratorio:

- ✓ Servicio de mensajería: si bien es confiable, tiene sus inconvenientes, como el tiempo entre la preparación, el envío y la recolección de las muestras, además del riesgo de derrame o rotura de los recipientes colectores de muestra.
- ✓ Sistema de tubos neumáticos hospitalarios: es rápido y confiable cuando se instalan como un servicio -punto a punto-, pero cuando se trata de mecanismos de conmutación para permitir que se transporte a varias locaciones surgen los

problemas de índole mecánica. En cuanto al diseño del sistema de tubos neumático, se precisa minuciosidad, para evitar la hemólisis de muestras provocada por la aceleración y desaceleración en el proceso de transporte (Fig. 9).

- ✓ Vehículos de vía eléctrica: tienen mayor capacidad de carga, lo cual permite adicionar hielo seco o *packs* de gel fríos con las muestras, además de no presentar el problema de aceleración/desaceleración.
- ✓ Robots móviles: utilizados para el transporte dentro del laboratorio o fuera del área central del mismo. Fácilmente adaptables para transportar contenedores de distinto tamaño y forma, reprogramables de acuerdo a los cambios de geometría del laboratorio. Como desventaja, requieren el uso de lotes de muestras para mayor eficiencia, y en la mayoría de los casos, que el personal de laboratorio retire las muestras en cada lugar de parada del robot móvil.



Figura 9. Sistemas de tubos neumáticos hospitalarios para el transporte de muestras de sangre desde el sitio de extracción al laboratorio central ([www.medicaexpo.es](http://www.medicaexpo.es)).

### Preparación de la muestra

La coagulación de la muestra en los tubos de recolección, la centrifugación y posterior traspaso del suero a tubos secundarios requieren de tiempo que demora la preparación de la muestra para el análisis. Con el objetivo de eliminar dicho retraso se han desarrollado

métodos automatizados que incluyen el uso de sangre entera para análisis (puede aplicarse a determinados analitos) o la automatización de la preparación de la muestra de manera completa (Fig. 10). Algunos equipos poseen la capacidad de realizar test adicionales en función del resultado de un primer test.

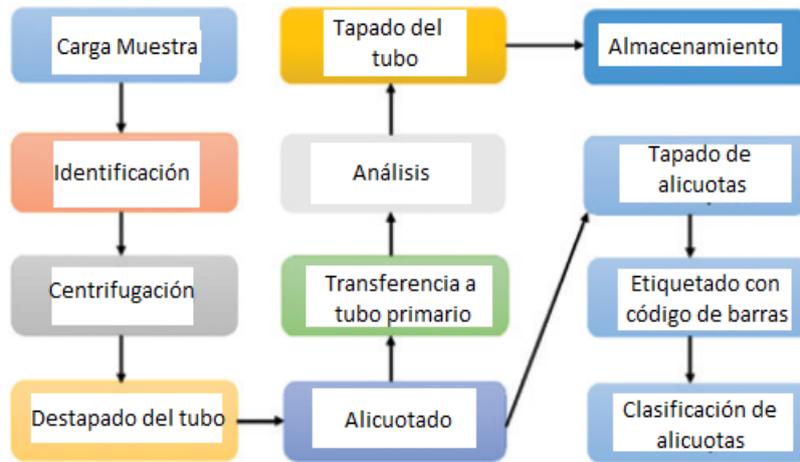


Figura 10. Módulos o partes funcionales de un sistema preanalítico modular integrado (Turk J Biochem 2017; 42(1): 1–13).

### Carga de muestras y aspiración

En la mayoría de los analizadores, la muestra para el análisis automático es suero o plasma (aunque existen pruebas que emplean orina, líquido cefalorraquídeo o sangre entera). Algunos equipos toman la muestra directamente del tubo original de recolección, los cuales contienen un separador que funciona como barrera entre el sobrenadante y las células (por ejemplo, tubos con gel). Otros analizadores toman la muestra de pocillos o tubos secundarios, generalmente específicos para cada tipo de analizador, llenados con alícuotas de la muestra original (Fig. 11).

Los pocillos están diseñados para minimizar el volumen muerto de muestra (cantidad mínima de muestra que debe estar presente en el pocillo para que la aspiración para el proceso analítico sea posible). Deben ser fabricados de un material inerte que no interactúe con la muestra, y con la forma adecuada, que minimice el proceso de evaporación.

Algunos fabricantes utilizan tubos cerrados, cuyo tapón es atravesado para el muestreo, evitando de ese modo escapes de muestra.

Por otro lado, las celdas que contienen muestras específicas deben contar con la temperatura correcta para el caso de analitos termolábiles, y la opacidad adecuada para el caso de analitos fotolábiles, con el propósito de reducir al máximo la posible degradación de los analitos.



Figura 11. Bandeja de muestras y reactivos autoanalizador CM250 WIENER.

La zona de carga de un analizador es el área en la cual las muestras son contenidas dentro del instrumento antes de ser analizadas (Fig. 12). En la mayoría de los casos se trata de platos circulares, bastidores o *racks*, o una *cadena en serpentina* de contenedores. Existen posiciones definidas en la bandeja de muestras (rutina, urgencias, calibradores y controles). Para el caso de identificación manual de muestras, se debe asociar cada celda de muestreo a un paciente específico. Una vez cargadas las determinaciones, el mecanismo de muestreo determina el volumen exacto de muestra requerido.



Figura 12. A) Soporte de muestras ATELLICA SIEMENS y B) Brazo mecánico toma tubo para posterior lectura de código de barras y transporte a sector analítico del equipo (<https://www.siemens-healthineers.com/>).

### Procesamiento de la muestra

Algunos procedimientos analíticos requieren la remoción de proteínas y otros interferentes de la muestra o separar la fracción unida de la libre en el caso de inmunoensayos heterogéneos. La remoción de proteínas y otros interferentes se logra por: 1) diálisis, 2) columna cromatográfica o 3) filtración.

### **Introducción de la muestra y transporte interno**

Se utilizan pipetas o sondas aspiradoras, las cuales poseen sensores de nivel de líquido (capacitivo, conductivo) y sensores de choque de aguja, detector de coágulos, burbujas, otros.

El muestreo depende del tipo de autoanalizador:

- ✓ Analizadores de flujo continuo: La sonda aspira al interior por medio de una bomba peristáltica, la misma que ingresa los reactivos. Son poco empleados por su inflexibilidad en el menú de pruebas.
- ✓ Sistemas de procesamiento discreto: variedad de sondas para muestras (rutina y urgencias) y reactivos. Las pipetas pueden ser de volumen fijo (utilizadas en instrumentos que llevan a cabo una pequeña variedad de pruebas) o variable.

#### *Efecto carry-over*

El arrastre o *carry-over* representa uno de los ensayos contemplados en la validación de un sistema analítico y consiste en transportar una cantidad de analito o reactivo de un ensayo inicial a otra reacción, contaminando la prueba inmediatamente posterior, provocando un aumento en la concentración esperada. Como afecta el resultado analítico de la reacción subsecuente, el proceso de *carry-over* debe ser minimizado. Muchos analizadores lo logran configurando un adecuado radio de flujo de descarga de muestra e incorporando estaciones de lavado de la sonda de muestreo. En algunos casos, como por ejemplo en la medición de gonadotropina coriónica, cuyo rango de concentraciones es muy amplio, se adicionan lavados extras para minimizar este efecto.

### **Manejo de reactivos y almacenamiento**

La mayoría de los analizadores utiliza reactivos contenidos en recipientes de plástico o vidrio. Para aquellos analizadores en los que el inventario de reactivos de trabajo se mantiene en el sistema, los volúmenes de reactivos almacenados dependen del número de pruebas a desarrollar entre los ciclos de reabastecimiento de reactivo. Cuando se trata de aparatos que no tienen un procesamiento continuo, los reactivos suelen almacenarse en los refrigeradores o estantes del laboratorio hasta nuevo uso.

El etiquetado de reactivos debe contener: 1) identificación del reactivo, 2) volumen contenido o número de pruebas que pueden realizarse con dicho volumen, 3) fecha de vencimiento y 4) número de lote. Algunos reactivos tienen un código de barras que nos permite acceder a la información necesaria referida, y provee en algunos casos, información extra como, por ejemplo, si está asociado a un sensor de nivel, nos alerta de forma automática cuando no hay cantidad suficiente de reactivo para llevar a cabo una reacción determinada (Fig. 13).



Figura 13. Carrusel de reactivos refrigerado. ARCHITECT i1000SR ([www.corelaboratory.abbott](http://www.corelaboratory.abbott)).

### Distribución de los reactivos

Los reactivos líquidos se toman y distribuyen a las cámaras de mezclado y reacción mediante bombas peristálticas o dispositivos de jeringas de desplazamiento positivo. Estas jeringas son comunes a muchos sistemas analíticos. El volumen de reactivo que cargan y descargan es programable. En aquellos analizadores donde la misma jeringa distribuye numerosos reactivos, el proceso de lavado es esencial para evitar el efecto *carry-over*.

### Fase de reacción química

Entre los factores importantes a tener en cuenta en esta fase se incluye el receptáculo donde se lleva a cabo la reacción, la cubeta en la cual se monitorea dicha reacción, la sincronización de la misma, el mezclado y transporte de los reactantes y las condiciones térmicas de los fluidos.

- ✓ Receptáculo de reacción y cubeta

En un sistema de flujo continuo, cada muestra pasa a través de la misma corriente continua y es sometida a idénticas reacciones analíticas, con igual velocidad. En dicho sistema, la reacción ocurre en el tubo que sirve como contenedor de flujo y cubeta al mismo tiempo.

En los sistemas discretos, como ya se mencionó, cada muestra en la corrida tiene su propio espacio físico y químico, separado del resto de las muestras. Utilizan receptáculos individuales de reacción (descartables o reutilizables), transportados a través del sistema

luego de que la muestra y el reactivo han sido dispensados, o usan una cámara de reacción estacionaria.

La limpieza de las cubetas o receptáculos reutilizables incluye la aspiración de la mezcla de reacción, un lavado repetido *in situ* con detergente alcalino o solución ácida y posterior enjuague con agua deionizada y secado (Fig. 14).

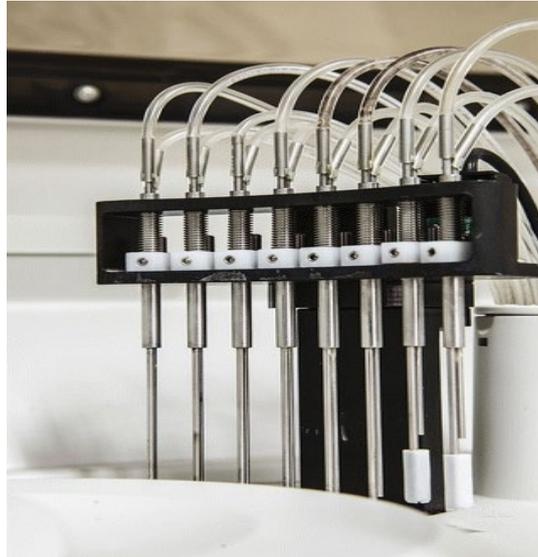


Figura 14. Las estaciones de lavado en un analizador de Química Clínica realizan las siguientes operaciones: (1) aspiran los desechos de reacción y dispensan agua, (2) aspiran y dispensan agua de enjuague, (3) aspiran agua de enjuague y dispensan agua para la medición del blanco y (4) aspiran el agua de la celda blanco para el secado (Roche Diagnostics).

✓ Sincronización de la reacción

Depende de factores como la velocidad de transporte de la mezcla de reacción a través del sistema hacia la estación de medida, los eventos cronometrados de adición o activación de reactivo relativos a la medición, o ambos.

En los sistemas discretos, las muestras y los reactivos son agregados a la cubeta en una secuencia de tiempo por medio de dispensadores, y las señales son medidas en intervalos para seguir el curso de cada reacción.

✓ Mezcla de reactivos

- En sistemas discretos, se describen variadas formas de mezclado:

1. Convección por inyección forzada.
2. Agitación magnética.
3. Desplazamiento lateral vigoroso.
4. Paleta giratoria.
5. Uso de energía ultrasónica.

- En sistemas continuos, el mezclado se basa en cambios de la corriente de flujo por acción de bombas mezcladoras.
- Reactivos Secos: por difusión.

✓ Incubación

Existen circuitos electrónicos para monitorizar y mantener la temperatura dentro de estrechos rangos de tolerancia. Incluyen: baños de aire, baños de agua y contacto con placas cálidas.

### Métodos de medición

El principio de la espectroscopía se aplica a todos los instrumentos, los más antiguos y los modernos. Lo que ha mejorado con el tiempo es la sensibilidad y la precisión de los métodos, el número de muestras que se pueden procesar por unidad de tiempo o la obtención de resultados a partir de cálculos automatizados en el equipo.

Los equipos automatizados de química utilizan una variedad de equipos ópticos de medición que incluyen:

- ✓ Fotometría / Espectrofotometría: Un espectrofotómetro es un instrumento para medir la transmitancia o absorbancia de una muestra, en función de la longitud de onda de la radiación electromagnética. Los componentes clave de un espectrofotómetro, son (Fig. 15):

- Fuente óptica: Lámparas de tungsteno, lámparas halógenas de cuarzo, lámparas de deuterio, lámparas de mercurio, lámparas de xenón y láser.
- Aislamiento espectral: la mayoría de los monocromadores actuales usa una red de difracción reflectante. La red consiste en una en una superficie óptica plana pulida sobre la que se graban líneas paralelas igualmente espaciadas.

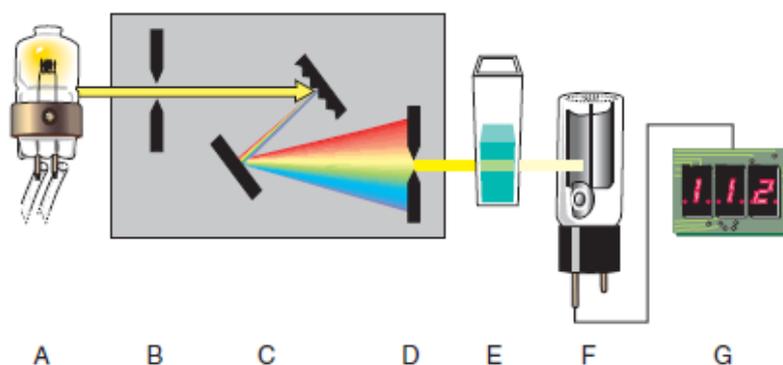


Figura 15. Componentes de un espectrofotómetro de haz único. A- Lámpara excitadora. B- Ranura de entrada. C- Monocromador. D- Ranura de salida. E- Cubeta. F- Fotodetector. G- Pantalla de diodo emisor de luz (LED) (Henry's Clinical Diag and Management by laboratory Methods, 2011).

- Detectores fotométricos: actualmente se utilizan fotodiodos. En un espectrofotómetro de arreglo de diodos, la muestra se ilumina de manera conjunta, es decir, con todos los componentes espectrales de la luz a la vez, por lo que absorbe simultáneamente la luz de diferentes longitudes de onda. A continuación, una red de reflexión difracta la luz transmitida. Esta instrumentación ayuda a adquirir el espectro UV-VIS más rápidamente de lo que se puede obtener con un espectrofotómetro de barrido tradicional.
- ✓ Fotometría de reflectancia: Implica la medida de la intensidad de la luz que es reflejada por una fase sólida, tras iluminar ésta con un haz de luz de una longitud de onda que es absorbida por los productos de interés.

Al igual que con otros fotómetros, los principales elementos de los reflectómetros incluyen una fuente de luz, normalmente una LED de larga duración de longitudes de onda específicas que son concentradas en una superficie de la muestra a través de un sistema de lentes, y la luz reflejada se mide mediante detectores. La intensidad de luz reflejada no es lineal con respecto a la concentración del analito, por lo que se utilizan algoritmos matemáticos para hacer lineal tal relación.

Vinculados a la denominada química seca, los reflectómetros suelen estar diseñados para medir las características físicas de las superficies, como los cambios de color en una tira reactiva (Fig. 16). Algunos sistemas sólo pueden realizar determinaciones colorimétricas, mientras que otros pueden llevar a cabo análisis enzimáticos.

Por otra parte, para sistemas de inmunoensayos se utilizan esquemas de reacción basados en principios como la fluorimetría, turbidimetría y nefelometría, quimioluminiscencia o electroquimioluminiscencia.

El inmunoensayo fluorescente (FIA) es la técnica automatizada de fluorescencia mejor conocida como Inmunoensayo de Polarización Fluorescente (FPIA) de Abbott, utilizada durante mucho tiempo en el analizador TDx. Los inmunoensayos automatizados están también disponibles en equipos Elecsys, Modular, Hitachi y Cobas (Roche), Immulite, Vista, Dimension, Advia y Atellica (Siemens), Access (Beckman-Coulter), AIA (Tosoh), analizadores AU (Olympus) y sistemas Architect (Abbott). Algunos analizadores pueden incluso emplear más de una metodología de inmunoensayo en su plataforma.

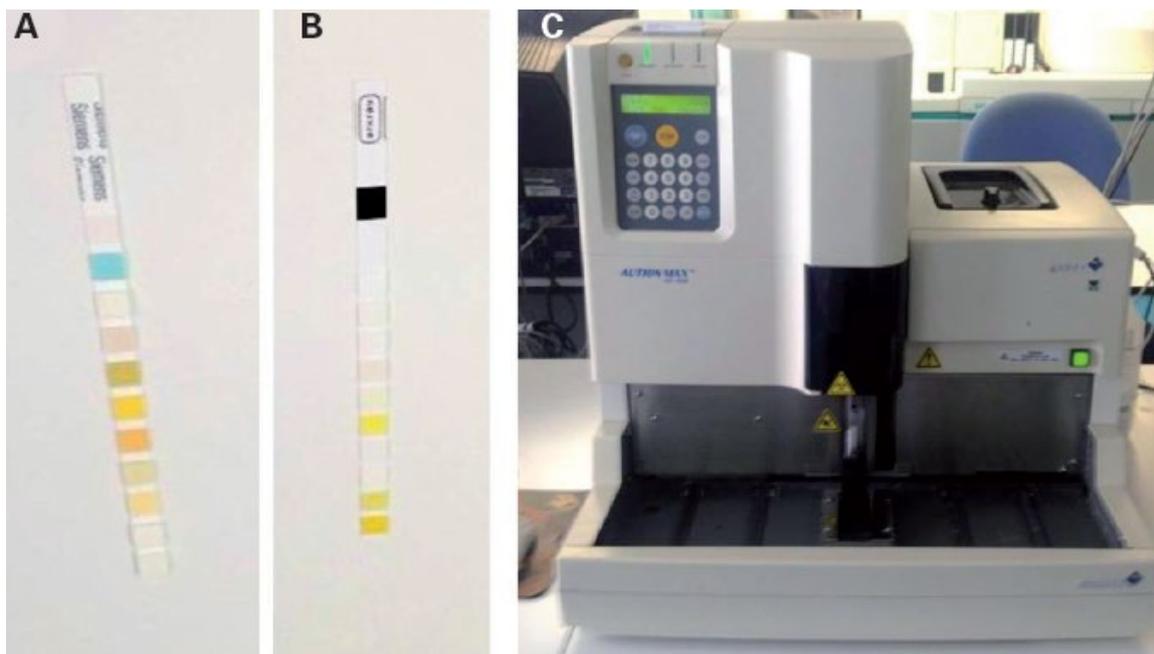


Figura 16. A) Tira reactiva para el análisis de orina manual: comparación visual con patrones; B) Tira reactiva para el análisis de orina mediante fotómetro de reflectancia. En la parte superior se observa el código magnético que contiene la información para realizar la lectura; C) Fotómetro de reflectancia para el análisis de tiras reactivas de orina. Los reactivos de química seca se diseñan para ser utilizados específicamente con un fotómetro de reflectancia concreto, capaz de leerlos e interpretar los resultados. (Análisis bioquímico I, Arán Ediciones, SL, 2016).

### Modos de Lectura

En un autoanalizador químico, después de que la muestra y el reactivo se mezclan en la cubeta de reacción, se llevan a cabo mediciones de absorbancia durante un periodo de tiempo determinado. La secuencia de valores de absorbancia obtenidos por estas mediciones se denomina "curva de reacción". Los autoanalizadores pueden desplegar la curva de reacción al momento de correr las muestras.

En este sentido, los ensayos espectrofotométricos pueden ser:

- De punto final (*endpoint method*): la reacción se completa después de un tiempo fijo.
- Cinéticas (*continuous monitoring method, rate method*): múltiples lecturas registradas durante un intervalo de tiempo especificado.
- De dos puntos (*fixed time method or two-point method*): la diferencia de absorbancia entre dos puntos se utiliza para el cálculo de los resultados.

Las lecturas pueden incluir blanco de suero, blanco de cubeta, blanco de reactivo, etc.

### Procesamiento de la señal, manejo de datos y proceso de control

Las señales analógicas detectadas son convertidas a formas digitales por convertidores analógicos-digitales en un rango de  $10^3$  a  $10^5$  conversiones por segundo. El procesamiento de datos por software ha permitido la automatización de diversos procedimientos como inmunoensayos no isotópicos y espectrometría de reflectancia porque los algoritmos

computacionales fácilmente transforman complejas respuestas estándar no lineales en curvas de calibración lineales. Funciones adicionales incluyen:

- ✓ Control por computadora de la función electromecánica del analizador, aseguran que todas las funciones se llevan a cabo de manera uniforme, repetitiva, y en la secuencia correcta, lo que aumenta la reproducibilidad de los resultados.
- ✓ Adquisición, procesamiento y almacenamiento computacional de los datos operacionales del analizador.
- ✓ Interfaz de la computadora con el operador del instrumento. Los mensajes diagnósticos de la computadora al operario describiendo el sitio y tipo de problema, permite una identificación rápida y pronta corrección de los mismos. Los datos de salida se miden en comparación con criterios preestablecidos y se muestran para la evaluación y valoración del operador. Dicha información específica que la linealidad de la reacción ha sido excedida, que la reacción no es lineal, que ha habido un agotamiento de sustrato, que la absorbancia de un reactivo es muy alta o muy baja, o que el desvío de la línea de base es excesivo. En general los equipos emiten alarmas de resultados (avisar sobre resultados o condiciones irregulares de la medición de las muestras, controles o calibradores) y alarmas sobre el funcionamiento del instrumento (avisar sobre situaciones irregulares del sistema). A partir de estos avisos, los operadores reprogramarán ciertas funciones del analizador, o bien, procederán al chequeo de todas las condiciones que pueden provocar las modificaciones informadas, para corregirlas y continuar en la línea correcta de procesamiento.
- ✓ Facilitar la comunicación entre la computadora y un ordenador central.
- ✓ Integración computacional de las funciones monitorizadas de uno o más analizadores con una sola estación de trabajo (Fig. 17).



Figura 17. Software-Ordenador conectado a autoanalizador Atellica-Siemens (<https://www.siemens-healthineers.com/>)

### Autoverificación

La autoverificación es el proceso de liberación automática de los datos de laboratorio; un software evalúa automáticamente los resultados de las pruebas según los criterios establecidos por el laboratorio, y publica estos resultados sin intervención directa del profesional bioquímico.

Según el documento de la CLSI -Autoverificación de Resultados de las pruebas del Laboratorio Clínico (AUTO10-A)- los criterios de autoverificación pueden ser definidos por el usuario y adaptados a diferentes entornos y servicios. Pueden incluir valores de referencia, resultados del control de calidad interno, alarmas de los instrumentos, verificación delta (comparación de resultados del examen actual contra otro resultado anterior del mismo paciente, si existiera), comprobaciones de lotes de reactivos, información demográfica sobre pacientes, historia clínica, valores críticos, entre otros. En algunos sistemas más sofisticados, también se pueden insertar comentarios u observaciones.

La implementación de la verificación automática conduce a estandarizar los criterios de verificación de resultados, reduce del tiempo de respuesta (TAT) y permite la optimización del tiempo de trabajo del personal de laboratorio. La rápida comunicación de resultados críticos, el aseguramiento de la calidad de los resultados liberados y una mayor seguridad para los pacientes son otras ventajas de la autoverificación.

Las reglas de autoverificación pueden insertarse en el middleware (software intermedio) y/o en el sistema de información del laboratorio (LIS). El software intermedio es el software que vincula al LIS con los instrumentos.

Sin embargo, la selección y el informe automatizado de los resultados de las pruebas de laboratorio no pueden reemplazar por completo el trabajo del/la bioquímico/a, que es fundamental para interpretar las razones por las que un resultado en particular no puede ser liberado. El proceso de selección e informe automatizado de resultados debe tener un "botón de parada" con el fin de evitar la publicación de un informe de laboratorio erróneo.

### **Control de Calidad Interno y Calibración**

La finalidad de las mediciones de control de calidad (CC) es supervisar el rendimiento del instrumento. El CC en un autoanalizador puede realizarse de forma automática o manual. Cada test tiene uno o varios materiales de CC asignados. El CC de rutina comprende todos los tests activados de todos los materiales de CC instalados para los módulos seleccionados.

El CC permite la evaluación estadística del comportamiento de cada analito a través de las gráficas de Youden, gráficas de Levey-Jennings con reglas de Westgard en tiempo real y para datos acumulados, etc.

Se recomienda realizar mediciones de CC en los siguientes casos:

- Cada día antes de la operación y al final de la operación para garantizar la precisión de las mediciones durante toda la operación.
- Cuando se carga un casete de reactivo nuevo para comprobar el reactivo.
- Después de la resolución de problemas para comprobar el rendimiento del instrumento.

Si los resultados de CC están dentro de los límites esperados, todo está en orden con el material de CC, el reactivo y el instrumento. Si los resultados de CC están fuera de los límites, se debe comprobar el material de CC, el reactivo y/o el sistema.

El objetivo de la calibración es garantizar la exactitud de las mediciones de todos los tests. Cada test se calibra para determinar un factor de calibración válido. Los valores medidos dependen del sistema de medición y de los reactivos, y pueden variar a lo largo del tiempo. La calibración se considera correcta cuando se satisfacen los criterios de calidad de calibración definidos previamente. De lo contrario, si el instrumento detecta una condición o resultado irregular, emite una alarma, la calibración se clasifica como errónea y se recomienda su repetición.

Las calibraciones pueden ser realizadas a demanda o en forma automática. Las calibraciones se efectúan a intervalos regulares para compensar los cambios que se producen con el transcurso del tiempo en los reactivos y en los sistemas de medición. El instrumento recomienda automáticamente todos los tests que necesitan calibración. Las calibraciones de intervalo se realizan en función del intervalo de los lotes o de los casetes.

Existen calibradores universales y especiales para las aplicaciones fotométricas. Un calibrador universal (p. ej., CFAS, CFAS Proteins) se utiliza para numerosas aplicaciones mientras que el calibrador especial es específico de algunas aplicaciones o de una sola.

En función del tipo de prueba (fotométrica, potenciométrica, inmunológica), existen diferentes métodos de calibración: lineales, no lineales, múltipuntos, 2 puntos de calibración, factor K, etc. Para la calibración recomendada, el instrumento determina el método de calibración automáticamente. Si los tests se calibran manualmente, debe seleccionar un método de calibración. En el caso de unidades que cuentan con ISE ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ), debe calibrarse con el método de calibración completa cada 24h. Después de realizar una calibración, es necesario validarla. El sistema lleva a cabo esta tarea gracias a las comprobaciones automáticas de la calibración.

## APLICACIONES DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN EL LABORATORIO CLÍNICO

Una revisión de los desarrollos actuales en la automatización de los laboratorios clínicos no estaría completa sin la inclusión de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Es una técnica analítica que combina la cromatografía como

técnica de separación, y la espectrometría de masas como técnica de detección, identificación y cuantificación para el análisis cualitativa y/o cuantitativa de compuestos orgánicos e inorgánicos.

La medicina clínica de laboratorio ha sido testigo de la introducción y evolución de la LC-MS/MS en los laboratorios clínicos de rutina durante los últimos años. Proporciona una mayor sensibilidad, especificidad y precisión que otras técnicas utilizadas en los laboratorios clínicos. Sin embargo, hay que precisar que se trata de equipos que poseen un elevado costo, y cuya metodología requiere una formación especializada del profesional de laboratorio para el manejo del equipo y correcta obtención e interpretación de los resultados.

En la actualidad la LC-MS/MS se está aplicando en varias áreas del laboratorio clínico: monitorización terapéutica de fármacos, toxicología, endocrinología, pediatría y microbiología (Tabla 2).

Tabla 2. Aplicaciones de la EM en el laboratorio clínico (ISBN 978-84-09-12875-4).

APLICACIONES DE LA EM EN EL LABORATORIO CLINICO				
APLICACION	ANALITOS	TIPO DE MUESTRA	ENSAYOS COMERCIALIZADOS	SISTEMAS EM
MONITORIZACION DE FARMACOS	Inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, everolimus)	Sangre total	SI	LC/MS/MS
	Antibióticos, antifúngicos, imatinib, busulfan, influximab	Plasma, suero	NO	LC/MS/MS
TOXICOLOGIA	Anfetaminas Barbitúricos Benzodiacepinas Cannabis Cocaína Opiáceos	Orina, sangre, saliva, sudor, cabello	NO	GC/MS LC/MS/MS
ENDOCRINOLOGIA	Testosterona Androstendiona DHEA Estrógenos Vitamina D	Plasma	NO	GC/MS LC/MS/MS
	17-OH-Progesterona	Sangre en papel, plasma	SI	LC/MS/MS
	Cortisol	Plasma, orina	NO	GC/MS LC/MS/MS
PEDIATRIA	Aminoácidos, succinilacetona, acilcarnitinas (cribado neonatal)	Sangre en papel	SI	LC/MS/MS
	Aminoácidos, succinilacetona, acilcarnitinas (diagnóstico)	Sangre en papel, plasma	SI	LC/MS/MS
		Fibroblastos, líquido cefalorraquídeo	NO	LC/MS/MS
		Orina	NO	GS/MS LC/MS/MS
MICROBIOLOGIA	Microorganismos	Cultivos de fluidos biológicos	NO	MS/MS MALDI-TOF

GC-MS: cromatografía gaseosa acoplada a espectroscopía de masas.

En el laboratorio de microbiología, el desarrollo de la tecnología MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry*: desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) ha permitido la utilización de la espectrometría de masas en la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada género y especie. Además, los análisis MALDI-TOF MS se utilizan en estudios de farmacogenómica, farmacoepigénica y farmacomicrobioma.

Si bien resta trabajar sobre aspectos como disponibilidad comercial de materiales de referencia certificados, calibradores y materiales de control de calidad, la LC-MS/MS sigue siendo una tecnología poderosa con capacidades analíticas distintivas que se pueden aplicar no sólo a determinaciones de rutina sino también a nuevos menús de pruebas que a futuro se presenten.

La implementación de la LC-MS/MS como ensayo de rutina en los laboratorios de diagnóstico clínico ofrece la oportunidad única de armonizar los resultados realizados por diferentes laboratorios, en diferentes momentos, en el mismo individuo, a fin de que puedan compararse y evaluarse para garantizar las buenas prácticas en la atención centrada en el paciente.

### **Futuro de la automatización**

Los procesos de automatización están cambiando y evolucionando continuamente, lo que conducirá a nuevos enfoques para la prestación de atención médica.

Los menús de prueba crecerán aún más y se necesitarán nuevas tecnologías para medir estos analitos. Estas nuevas tecnologías habrá que incorporarlas en los sistemas existentes. Otra demanda que los fabricantes de sistemas tendrán que abordar es la capacidad de vincular diferentes instrumentos o módulos a sus sistemas. Se requerirá una interfaz estandarizada para lograr esto.

A medida que evoluciona el campo de la proteómica, también lo hará la metodología e instrumentos necesarios para la medición. La proteómica se perfila como una potente herramienta para el estudio de aspectos fisiológicos y patológicos del ser humano; sus técnicas incluyen la electroforesis bidimensional, la espectrometría de masas y las micromatrices de proteínas. La búsqueda activa de biomarcadores a partir de casi todos los líquidos biológicos y tejidos de varias naturalezas es una de las principales aplicaciones de la proteómica. Sistemas proteómicos están llegando actualmente al mercado y, con el tiempo, este tipo de pruebas encontrarán un lugar en el laboratorio clínico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Burtis, C., Ashwood, E., Bruns, D. (2015). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular. Diagnostics (7th Ed). Madrid, España: Elsevier.
- McPherson R., Pincus M. (2011). Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods (22nd Ed). Elsevier.
- Bishop, M., Fody E., Schoeff L.E. (2006). Química Clínica: principios, procedimientos y correlaciones (5º Ed). McGraw Hill-Interamericana.
- Kumar, V., Gill, K.D. (2018). Automation in Clinical Laboratory. In: Basic Concepts in Clinical Biochemistry: A Practical Guide. Springer, Singapore.
- Bakan, E., Ozturk, N., Baygutalp, NK. (2017). Automation in the clinical laboratory: integration of several analytical and intra-laboratory pre- and post-analytical systems. Turk J Biochem 42:1-13.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). Laboratory automation: communications with automated clinical laboratory systems, instruments, devices, and information systems. CLSI Approved Standard AUTO 03-A2; Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Bakan, E., Umudum, F. (2021). Automation of extra-analytical phase for clinical laboratory. Turk J Biochem 46: 115-28.
- López, R.M., Pajares, S. (2020). La espectrometría de masas. Aplicaciones en el laboratorio clínico. Ed. Cont. Lab. Clin 47: 85-97.

### CAPÍTULO III

## ALTERACIONES DE LA FUNCIÓN GASTROINTESTINAL.

### FISIOPATOLOGÍA Y LABORATORIO



#### OBJETIVOS

- Conocer las bases fisiopatológicas de las enfermedades que se desarrollan en el tracto gastrointestinal e identificar las pruebas de laboratorio que contribuyen a su diagnóstico.
- Integrar los conocimientos adquiridos a partir de la resolución de casos clínicos.

#### INTRODUCCIÓN

La evolución del conocimiento, el desarrollo tecnológico y el aporte del laboratorio clínico ha contribuido a un diagnóstico precoz, prevención y al tratamiento adecuado de las enfermedades digestivas. Las patologías gastrointestinales (GI) son muy habituales y representan más del 20% de las consultas médicas, el 15% de los ingresos en hospitales y el 14% de la mortalidad de la población general. Son causa frecuente de enfermedad clínica con predominio de lesiones inflamatorias y neoplásicas.

Durante la última década, los trastornos digestivos han aumentado en las personas jóvenes debido a cambios en la alimentación, reducción en la actividad física, estrés y estilo de vida, entre otros. Pueden presentarse en forma aguda, con un período corto de evolución, o como causas crónicas que pueden requerir terapéuticas prolongadas. Además, es interesante considerar, la frecuencia de la enfermedad y la edad de aparición, los dos extremos de la vida de las personas; los lactantes e infancia y las del adulto, con las modificaciones fisiológicas propias del envejecimiento que traen consigo alteraciones de la ingestión, digestión y absorción de los alimentos. En particular, en este último grupo etario, se hace imposible enumerar y abordar las múltiples enfermedades en toda su extensión, ya que es un verdadero abanico que incluye desde trastornos motores hasta causas orgánicas, de las cuales hay etiologías que aún no se pueden definir.

Las enfermedades GI se presentan con uno o más de los siguientes síntomas y signos: 1) dolor abdominal o dolor torácico; 2) alteración en la ingestión de alimentos (p. ej., como resultado de náuseas, vómitos), **disfagia** (dificultad para tragar), **odinofagia** (dolor al tragar) o **anorexia** (falta de apetito); 3) alteración de los movimientos intestinales (diarrea o estreñimiento) y 4) hemorragia del tracto GI, ya sea sin previo aviso o precedida por uno o más de los signos o síntomas anteriores.

En general, la enfermedad GI puede limitarse al tubo digestivo (p. ej., reflujo gastroesofágico (ERGE), úlcera péptica, enfermedad diverticular), ser una manifestación de un trastorno sistémico (p. ej., enfermedad inflamatoria intestinal), o presentarse como una enfermedad sistémica causada por un proceso patológico GI primario (p. ej., deficiencias de vitamina por malabsorción, entre otras). Dado que diferentes partes del tubo digestivo se especializan en ciertas funciones, las causas, consecuencias y manifestaciones más prominentes de la enfermedad difieren de un sitio anatómico a otro.

En este capítulo se hará una revisión sobre los aspectos anátomo-fisiológicos y bioquímicos del estómago e intestino, para luego describir las patologías más frecuentes que afectan a dichos órganos y su relación con las pruebas diagnósticas de laboratorio.

### **Bases anatómo-fisiológicas. Mecanismos generales de control del tracto Gastrointestinal (GI)**

El aparato digestivo está formado por el tracto digestivo (tubo digestivo, tracto gastrointestinal) y las glándulas anexas (glándulas salivales, hígado, vesícula biliar y páncreas). Se desarrolla a partir de una estructura única y continua y, en su totalidad, incluido los conductos, es de procedencia endodérmica.

El **tubo digestivo** es un tubo hueco que incluye la cavidad bucal, la faringe que comunica el esófago con el estómago, el intestino delgado (yeyuno e íleon), el intestino grueso (colon), recto y ano (Fig. 1). Cada región realiza funciones únicas, complementarias e integradas que, en conjunto, sirven para regular la ingesta, el procesamiento y la absorción de los nutrientes ingeridos, así como la eliminación de los productos de desecho. En particular, el intestino es el sitio principal en el que el sistema inmunitario interactúa con diversos antígenos presentes en los alimentos y la microbiota intestinal. Por eso, no resulta sorprendente que el intestino delgado y el colon sean el origen de infecciones, procesos inflamatorios y neoplásicos.

En toda su extensión, la pared del tracto digestivo -excepto en la boca, faringe y la porción proximal del esófago-, se compone por cuatro capas (desde la luz hacia afuera): la **mucosa**, **submucosa**, **muscular** (fibras de músculo liso dispuestas en sentido circular y longitudinal) y **adventicia o serosa externa** (constituye el peritoneo y tiene continuidad con el mesenterio). Asimismo, se ubican los plexos nerviosos intrínsecos, el submucoso (de Meissner) y muscular (de Auerbach). Ambos ejercen un papel esencial, el primero como un sistema sensor y el segundo como sistema efector de la función motora y secretora. Las fibras posganglionares de estos plexos inervan las células secretoras y musculares, la

inervación vagal al fundus (fondo) y el cuerpo gástrico estimula la secreción de ácido, mientras que la inervación antral promueve principalmente la motilidad.

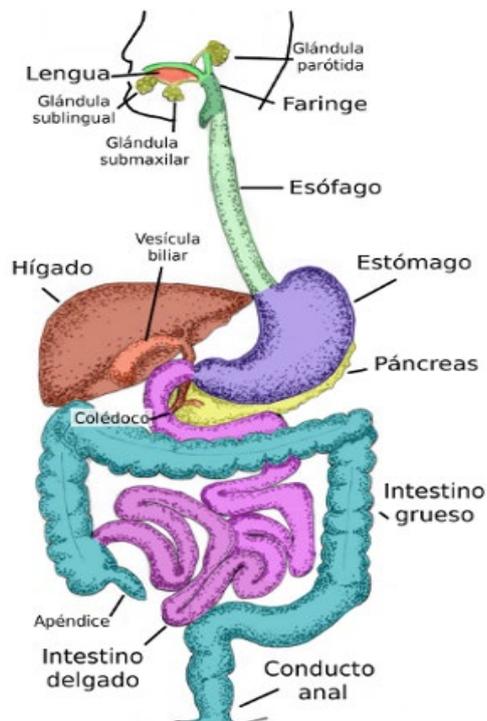


Figura 1. Esquema de los diferentes componentes del sistema digestivo.  
[https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada\\_o\\_a\\_08digestivo.php](https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada_o_a_08digestivo.php).

La irrigación gastroduodenal es abundante y aportada por ramas que se originan en el tronco celíaco y la arteria mesentérica superior. La distribución del sistema venoso es similar y coincidente con el arterial, drenando en la vena porta o en sus tributarias (esplénica o mesentérica superior). El drenaje linfático presenta una distribución análoga, y forma un plexo submucoso que se entremezcla con el vascular para terminar desembocando en los ganglios linfáticos celíacos que se comunican entre sí.

## ESTÓMAGO

El estómago se ubica en el lado izquierdo del abdomen y es la porción más dilatada del tubo digestivo. Se comunica con el esófago a través de un orificio llamado cardias y con el duodeno (intestino delgado), por el conducto pilórico. Desde un punto de vista anatómico, se divide en cuatro regiones: el cardias, el fondo (parte superior próxima al cardias), el cuerpo (parte media) y el antro pilórico (parte inferior, cercana al intestino delgado, donde se mezclan los alimentos con el jugo gástrico) (Fig. 2).

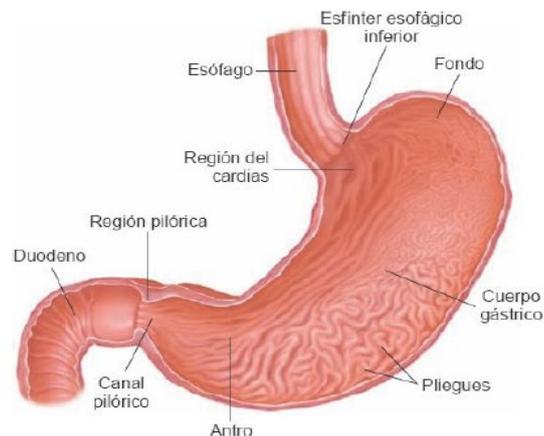


Figura 2. Estructura del estómago. Porth Fisiopatología. Alteraciones de la salud. Conceptos básicos. 10ª Ed (2019).

Desde el punto de vista funcional, la mucosa gástrica tapiza por completo la cara interna del estómago. Está formada por epitelio cilíndrico simple y contiene numerosas glándulas. El epitelio de las **glándulas cardiales**, poco profundas, está revestido por células foveolares secretoras de mucina y lisozima (enzima que destruye la pared de las bacterias). Las **glándulas del cuerpo y el fondo** contienen diferentes tipos celulares: 1) células mucosas (productoras de moco), bicarbonato, agua y pepsinógeno (PG) de tipos I y II; 2) células parietales u oxínticas, secretan ácido clorhídrico (HCl) y factor intrínseco (FI); 3) células principales, sintetizan enzimas digestivas, como el PG-I, que al pH bajo de los jugos gástricos se convierte en **pepsina** (inicia la degradación de las proteínas) y, 4) células enteroendocrinas distribuidas en la base de las glándulas gástricas, y se identifican tres tipos: células G, células D y células tipo enterocromafines (células ECL). Dichas células se diferencian por sus productos de síntesis como gastrina (células G), somatostatina (células D) e histamina (células ECL), y por diversos péptidos que poseen efectos endocrinos y paracrinos sobre la secreción ácida. Las **glándulas pilóricas** (antro pilórico) contienen abundantes células G para estimular la secreción luminal de HCl y células mucosas (secretan PG-II). En la proximidad de las células glandulares se sitúan los mastocitos que contienen histamina (Fig. 3).

En particular, la **mucina** forma una delgada capa de moco, que impide el contacto directo entre las partículas de alimento grandes y el epitelio. La **capa mucosa** estimula la formación de una capa de líquido sobre el epitelio que protege la mucosa y el pH es neutro por la secreción de iones bicarbonato desde las células del epitelio de superficie. Por último, el flujo de la mucosa gástrica tampona de forma eficaz y elimina los protones que retrodifunden hacia la lámina propia. El HCl, la pepsina y las lipasas (lingual y gástrica) representan los factores agresivos de la mucosa gástrica mientras que el moco y el bicarbonato son dos de

los componentes que la protegen (barrera mucosa). Toda lesión inflamatoria que afecte a la mucosa gástrica se denomina **gastritis**.

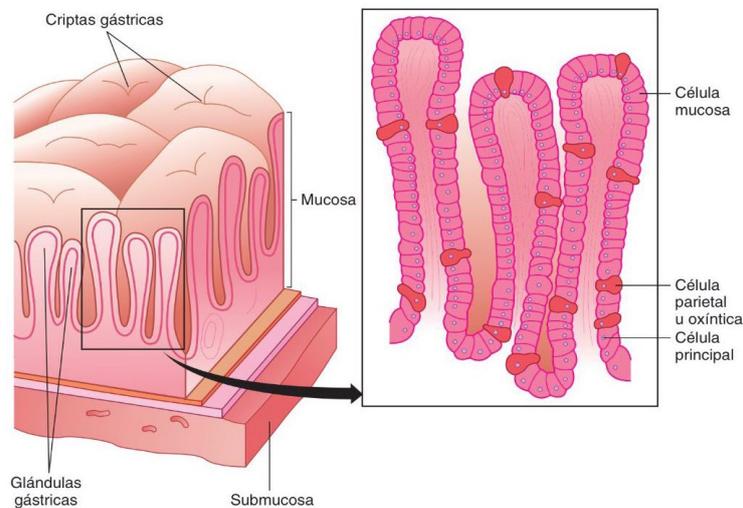


Figura 3. Cripta gástrica del cuerpo del estómago. Porth Fisiopatología. Alteraciones de la salud. Conceptos básicos, 10ª Ed. (2019).

### **Funciones del estómago: Secretora y motora**

- Servir como depósito a los alimentos durante la ingesta.
- Facilitar su digestión mediante la secreción de HCl y pepsina.
- Mezclar y triturar los alimentos.
- Regular la salida del quimo hacia el intestino delgado.
- Intervenir en la sensación de saciedad y de hambre.
- Reducir la flora bacteriana que alcanza el intestino delgado evitando el sobrecrecimiento de gérmenes.
- Participar en la hematopoyesis mediante la secreción de factor intrínseco (FI).
- Proteger su mucosa de la secreción clorhidropéptica y del jugo duodenal.

## **INTESTINO**

El **intestino delgado** conforma la porción intermedia y es la parte más larga del tubo digestivo. Se extiende desde el orificio pilórico hasta el intestino grueso (ciego) y consta de tres partes: duodeno, yeyuno e íleon. El duodeno conecta al estómago con el yeyuno, y aloja el sitio de drenaje del conducto biliar común y del conducto pancreático. Sus funciones principales son completar la digestión de los alimentos y absorber nutrientes.

Hay características únicas en la capa mucosa y la submucosa del intestino delgado, que ayudan a aumentar significativamente su superficie de absorción: 1) **pliegues circulares**

(válvulas conniventes o válvulas de Kerckring), son mayores y abundantes en el duodeno y el yeyuno, y van desapareciendo en el íleon terminal; 2) **vellosidades**, se extienden de la mucosa en forma de dedos que se proyectan hacia el lumen del intestino y cada una contiene una rama terminal única de las ramas arterial, venosa y linfática. Entre las vellosidades se ubican las glándulas (criptas de Lieberkühn) que secretan el jugo intestinal rico en enzimas digestivas. En las criptas residen las células madre del epitelio intestinal, las calciliares (mucosecretoras), las endocrinas y las Paneth (se encargan de la inmunidad innata, secretan antimicrobianos como lisozimas, defensinas y glucoproteínas, regulando la flora intestinal); y además secretan iones, agua y aportan IgA; y 3) **microvellosidades**, son proyecciones presentes en la superficie apical de cada célula intestinal (enterocito) (Fig. 4).

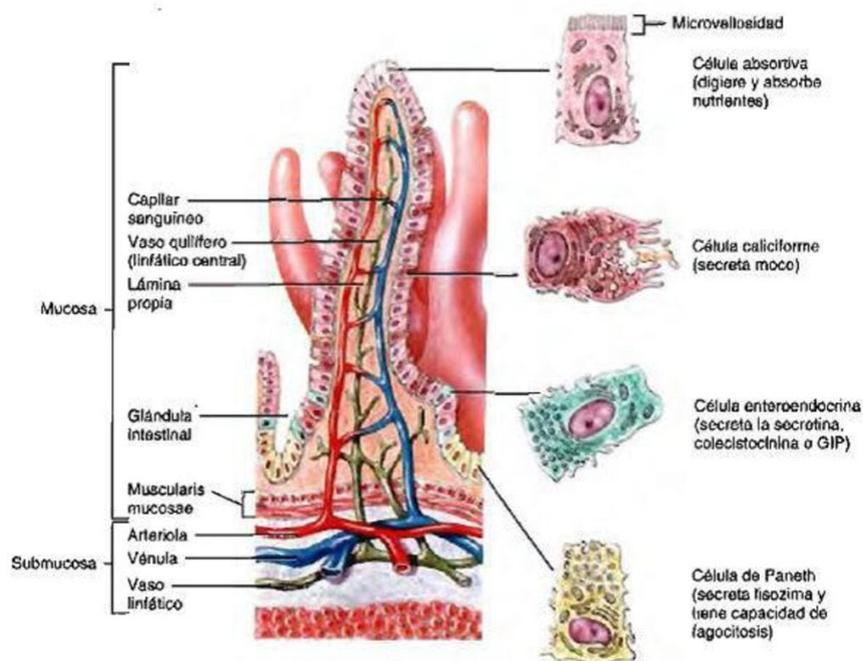


Figura 4. Estructura de las vellosidades intestinales y las criptas. La capa epitelial contiene células endocrinas y linfocitos intraepiteliales dispersos. En la base de la cripta se disponen las células de Paneth y las células progenitoras que permiten el recambio incesante del epitelio de la cripta y las vellosidades. Las células del epitelio se renuevan cada 3 a 5 días en adultos sanos. Hum Physiol. 10° ed., NY: McGraw-Hill, 2008.

El intestino delgado tiene estructuras que son específicas de cada segmento: a) en la submucosa del duodeno se hallan las **glándulas de Brunner** que producen un moco rico en sustancias alcalinas (iones bicarbonato, glicoproteínas y PG II) protegiendo al duodeno de los efectos corrosivos del ácido gástrico; b) en el íleon se encuentran las **Placas de Peyer**, que son parte del tejido linfoide asociado al intestino (GALT: *Gut Associated Lymphoid Tissue*) (Fig. 5). El GALT muestra una estructura diferenciada: el **GALT organizado**, inductor de la respuesta inmunitaria intestinal, está constituido por folículos linfoides

aislados, folículos linfoides asociados o placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos; y el **GALT difuso**, efector de la respuesta inmunitaria, está integrado por poblaciones de linfocitos dispersas en el entramado epitelial (*intraepithelial lymphocytes*, IEL) o en la lámina propia intestinal (*lamina propria lymphocytes*, LPL). De esta manera se desarrolla una defensa eficaz y adecuada al tipo de estímulo; así el sistema frena los patógenos invasivos e induce tolerancia oral en respuesta a antígenos inocuos, procedentes de la dieta y del propio epitelio intestinal. Los anticuerpos secretados, de isotipo IgA, constituyen también un mecanismo de defensa en todas las mucosas del organismo.

En general, un mal funcionamiento del intestino delgado puede deberse a diferentes causas: trastornos obstructivos, enfermedades infecciosas, inflamatorias, úlcera duodenal, neoplasias, entre otras.

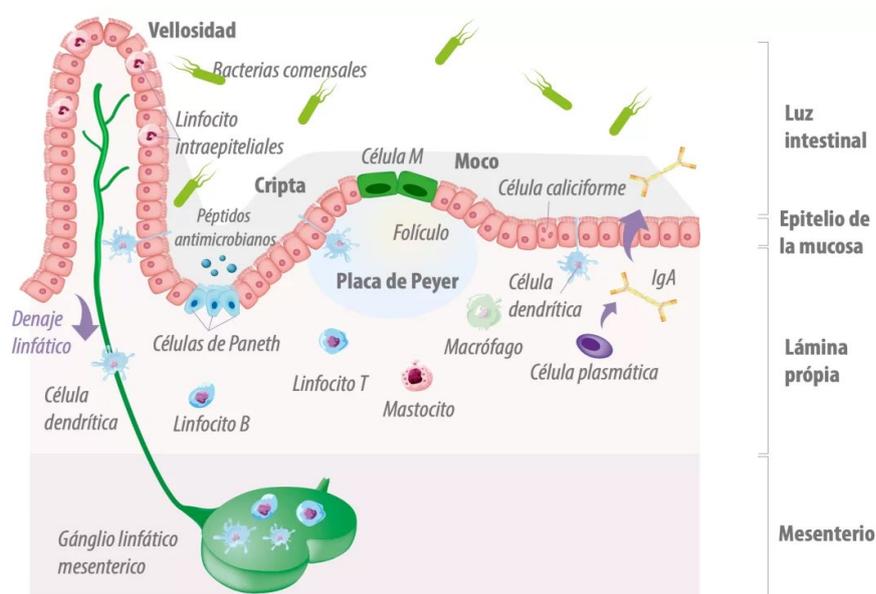


Figura 5. Estructura de defensa de la barrera epitelial intestinal (Rev Esp Enf Dig 2008; 100: 29-34).

El **intestino grueso** se forma en la región distal del tubo gastrointestinal. Se divide en ciego, colon, recto y canal anal. El ciego es una bolsa que se proyecta en dirección podálica en el sitio de unión del íleon y el colon. La válvula ileocecal se ubica en el extremo superior del ciego, e impide el retorno de las heces desde el ciego al intestino delgado.

El colon se divide funcionalmente en cuatro segmentos: el ascendente (se extiende desde el ciego hasta la cara inferior del hígado), el transversal (atraviesa la mitad superior de la cavidad abdominal de derecha a izquierda, y luego se curva para formar el ángulo colónico izquierdo o esplénico), el descendente, el sigmoide (desde el ángulo esplénico hasta el recto) y el recto (se proyecta desde el colon sigmoide hasta el ano) (Fig. 6).

El intestino grueso no tiene vellosidades ni pliegues circulares, salvo en la parte distal del recto. Al igual que el resto del tracto digestivo, la pared del intestino está formada por cuatro capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La mucosa presenta un epitelio simple cilíndrico que forma numerosas glándulas mucosas tubulares (criptas de Lieberkühn). Se distinguen células epiteliales de absorción (enterocitos) revestidas con microvellosidades sobre su superficie, así como células caliciformes. Las criptas del colon contienen células caliciformes, endocrinas, enterocitos y células madre epiteliales.

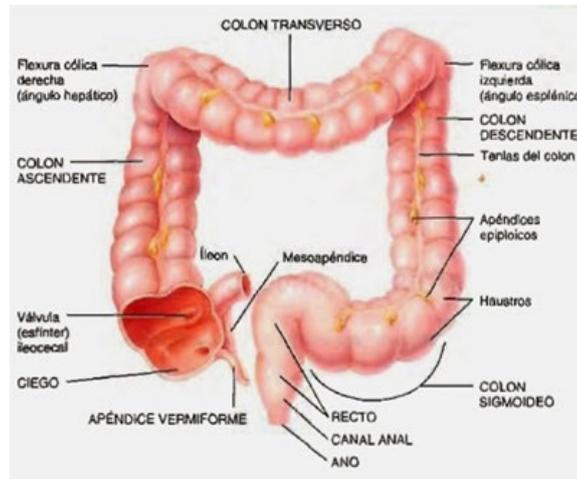


Figura 6. Estructura del intestino grueso (<https://www.educa2.madrid.org/>).

Funciones del intestino grueso:

- 1- Absorción de agua, electrolitos ( $\text{Na}^+$ ), minerales y vitaminas.
- 2- Síntesis de ciertas vitaminas del grupo B y vitamina K, por bacterias intestinales.
- 3- Almacenamiento temporal de desechos (formación de heces).
- 4- Eliminación de desechos del cuerpo (defecación).

## **FUNCIONES HORMONALES, SECRETORAS Y DIGESTIVAS**

### **Hormonas GI y Péptidos reguladores**

El tracto GI constituye el mayor órgano endocrino, aunque posee características muy diferentes a las glándulas de secreción interna. En contraposición con éstas, no forma una masa glandular uniforme, sino que las células endocrinas están diseminadas en la mucosa del estómago, el intestino delgado y el colon. Las hormonas GI regulan los procesos digestivos, modificando la secreción, absorción, motilidad y flujo sanguíneo mediante efectos endocrinos, pueden actuar como neurotransmisores/neuromoduladores, y en algunos casos

tienen efecto paracrinos. Esta multiplicidad de funciones ha motivado a que también se las conozca como péptidos reguladores.

Las hormonas digestivas pueden interactuar con el SNC por medio del sistema nervioso entérico y el autónomo. Entre las hormonas que sintetiza el tubo GI se encuentran: gastrina, grelina, secretina, CCK e incretina; las cuales influyen sobre el apetito, motilidad GI, actividad enzimática, concentraciones de electrolitos, secreción y actividad de hormonas (hormona del crecimiento, insulina y glucagón).

**Gastrina** es sintetizada por las células G (antro gástrico) y liberada en respuesta a proteínas, péptidos y aminoácidos de la dieta. Su función es estimular la secreción de ácido gástrico y la secreción de enzimas pancreáticas. Además, favorece la liberación de PG y FI, de secretina (por la mucosa del intestino delgado), de bilis hepática; aumenta la motilidad gástrica e intestinal, el flujo sanguíneo e inhibe el vaciado gástrico. La secreción es activada por el péptido intestinal vasoactivo (VIP) e inhibida por Somatostatina.

Se genera a partir de un precursor de 101 aminoácidos (preprogastrina) y por procesamiento del mismo se originan diferentes péptidos. Las formas más activas son G-34 (vida media: 6 min) y G-17 (vida media: 36 min), producidas por la acción de tripsina en las células G, siendo G-17 más potente que G-34 para estimular la secreción de ácido gástrico.

**Grelina** es una hormona peptídica que sintetizan las células oxínticas gástricas. Estimula la secreción de ácido y la motilidad gástrica. Posee efecto orexigénico (estimula los centros del apetito). Sus niveles séricos tienen fluctuaciones circadianas, que se sincronizan con las horas de la comida, al aumentar de manera preprandial seguida de rápidas reducciones posprandiales.

**Somatostatina** en el tracto digestivo, es producida por células D. Es un inhibidor fisiológico paracrino, y su función es disminuir las secreciones endocrinas y paracrinas, el flujo sanguíneo y la motilidad. Su vida media es de 3 minutos. A nivel del estómago inhibe la liberación de gastrina y HCl, en el duodeno la secreción de secretina y colecistoquinina y en el páncreas la liberación de glucagón. En conjunto, todas estas acciones conducen a una reducción en la velocidad a la que se absorben los nutrientes del contenido del intestino.

El intestino es la fuente de las hormonas peptídicas **CCK, secretina e incretinas**.

**CCK** es producida por las células I del duodeno y el yeyuno, y como neurotransmisor se libera en varias regiones cerebrales. Promueve el crecimiento del páncreas, relaja el esfínter de Oddi y estimula las secreciones de las glándulas de Brunner. Posee el mismo pentapéptido terminal que la gastrina, por lo tanto tiene efecto estimulante sobre: la secreción gástrica de HCl y PG; motilidad antral; secreción de bicarbonato pancreático (potenciando la acción de la secretina); la secreción biliar de líquido y bicarbonato, y regula la contracción de la vesícula biliar y el vaciamiento gástrico.

**Secretina** es secretada por las células S en la mucosa del duodeno y el yeyuno, inhibe la secreción de ácido gástrico. Su vida media: 4 min. El ingreso del quimo ácido al intestino estimula la liberación de secretina, que inhibe la secreción de gastrina y, en respuesta al pH duodenal, estimula al páncreas para secretar líquido con alta concentración de bicarbonato. Otras acciones incluyen la estimulación de la secreción de bicarbonato y agua del hígado y de las glándulas de Brunner; aumento de la contracción de la vesícula biliar y del flujo biliar hepático; liberación de enzimas pancreáticas y de PG (de células principales del estómago); reducción de la movilidad gástrica y duodenal, y promoción del crecimiento pancreático.

**Incretinas** son producidas en respuesta a la ingesta de alimentos y con efecto sobre las células de los islotes de Langerhans, aumentan la secreción y liberación de la insulina y disminuyen la secreción de glucagón dependiendo de los niveles de glucosa circulante.

Las principales incretinas son el **GLP-1** (péptido 1 similar al glucagón) y **GIP** (polipéptido insulínico dependiente de glucosa, antes polipéptido inhibidor gástrico).

**GLP-1** es secretado por las células L del intestino -íleon distal y colon-, donde colocaliza con el péptido YY (PYY) y oxintomodulina; en las células alfa del islote pancreático y en áreas neuronales (región hipotalámica). Tiene un potente efecto insulínico y actividad anorexigénica. **GIP** es sintetizado por las células K intestinales (duodeno y yeyuno) tras la ingesta de proteínas, hidratos de carbono y principalmente lípidos (Fig. 7). Actualmente se considera que las incretinas son responsables de hasta un 60% de la liberación de insulina posprandial; y este efecto depende de la concentración de glucosa existente en cada momento. En las personas con diabetes tipo 2 se observa una disminución de esta acción fisiológica como también de la secreción de GIP (especialmente de GLP-1), aunque la respuesta insulínica se revierte parcialmente cuando se administra GLP-1 exógeno (pero no GIP). Este hecho, sugiere un papel relevante del GLP-1 en la regulación de la secreción pancreática de insulina.

#### Otros péptidos intestinales

**Serotonina** es secretada por las células enterocromafines del intestino a partir de triptófano en respuesta a cambios en los nutrientes lumbales, metabolitos microbianos o luego del consumo de comida y participa en la regulación de la motilidad e inflamación intestinal.

**Neurotensina** es liberada por las células N enteroendocrinas y las neuronas hipotalámicas, tiene implicaciones en la homeostasis intestinal y metabólica. Se secreta en respuesta a los lípidos lumbales, y actúa localmente para aumentar la absorción de lípidos mediante el aumento de la reabsorción de ácidos biliares y la motilidad de la vesícula biliar.

Tabla 1. Hormonas digestivas específicas y sus actividades

HORMONA	SITIO DE SECRECIÓN	ESTÍMULO PARA LA SECRECIÓN	ACTIVIDAD
Colecistocinina	Duodeno, yeyuno	Productos de la digestión de proteínas y de ácidos grasos de cadena larga	Estimula la contracción de la vesícula biliar y la secreción de enzimas pancreáticas, reduce la velocidad del vaciamiento gástrico, inhibe el consumo de alimentos.
Gastrina	Antro gástrico, duodeno	Estimulación vagal, adrenalina, aminoácidos neutrales, alimentos con calcio (como la leche), alcohol Inhibición de la secreción por el contenido ácido del antro gástrico (pH < 2.5)	Estimula la secreción de ácido gástrico y pepsinógeno, incrementa el flujo sanguíneo gástrico, estimula las contracciones del músculo liso gástrico y el crecimiento de las células de la mucosa gástrica intestinal.
Grelina	Fondo gástrico	Nutricional (ayuno) y hormonal (disminución en las concentraciones de la hormona del crecimiento)	Estimula la secreción de hormona del crecimiento; actúa como una señal estimulante del apetito a partir del estómago, cuando se requiere un aumento de la eficacia metabólica.
Péptido similar al glucagón de tipo 1	Segmentos distales del intestino delgado	Alimento rico en hidratos de carbono	Aumenta la liberación de insulina; suprime la liberación de glucagón; reduce la velocidad del vaciamiento gástrico; disminuye el apetito y el peso corporal.
Polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa	Intestino delgado, en particular yeyuno	Alimento rico en hidratos de carbono	Incrementa la liberación de insulina.
Secretina	Duodeno	pH ácido o quimo que ingresa al duodeno (pH < 3.0)	

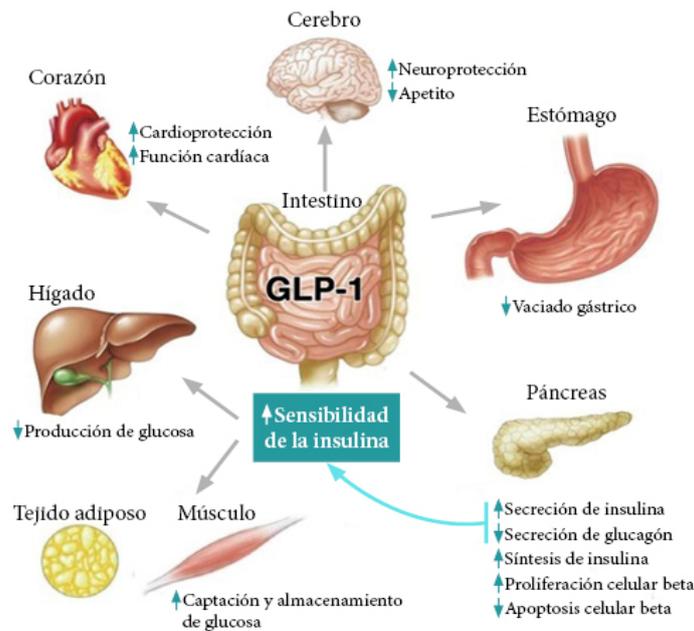


Figura 7. Acciones del GLP-1 en los tejidos periféricos Adaptada de: Sociedad Española de Diabetes (SED). Tratado de diabetes mellitus. Ed. Médica Panamericana; 2017.

## SECRECIONES GASTROINTESTINALES

### - Secreción gástrica

Las funciones primordiales del ácido gástrico son la degradación química y la desinfección del alimento ingerido. El jugo gástrico contiene principalmente HCl, PG I y II, FI,

iones (sodio, potasio, bicarbonato y cloro), PG, péptidos reguladores y moco, junto con saliva deglutida y contenido duodenal refluido.

### **La secreción gástrica ocurre en respuesta a varios estímulos:**

- Impulsos neurogénicos del cerebro transmitidos a través de los nervios vagos, por ejemplo en respuesta a la observación, oler o anticipar la comida.
- Distensión del estómago por sólidos o líquidos.
- Contacto de la mucosa gástrica con productos de degradación proteica (secretagogos).
- La gastrina se secreta en la mucosa gástrica y en el duodeno en respuesta a la estimulación vagal y el contacto con secretagogos.

### **Fases y regulación de la secreción de ácido**

El ácido facilita la digestión de proteínas y la absorción de calcio, hierro y vitamina B12, y ejerce una acción protectora contra microorganismos exógenos.

La secreción de ácido se divide en tres fases interrelacionadas: cefálica, gástrica e intestinal. En la fase cefálica, la simple imaginación o percepción visual de la comida es capaz de aumentar el estímulo vagal e iniciar la actividad GI (oler, probar o tragar). La fase gástrica es producto del efecto químico de los alimentos y la distensión gástrica, donde la gastrina es su principal mediador. La última, la intestinal, es responsable de una pequeña proporción de la secreción de ácido en respuesta a la comida. Respecto al papel de los distintos alimentos en la producción de ácido, las proteínas y los aminoácidos estimulan la secreción de ácido mientras los carbohidratos y las grasas lo inhiben.

### **Componentes de la secreción gástrica**

Durante el proceso de secreción de HCl, el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) producido por el metabolismo anaeróbico se combina con agua, reacción que cataliza la anhidrasa carbónica para obtener ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), que se disocia en  $\text{H}^+$  y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). El  $\text{H}^+$  se secreta junto con  $\text{Cl}^-$  hacia el interior del estómago, y el  $\text{HCO}_3^-$  se desplaza fuera de la célula y a la sangre a través de la membrana basolateral. El  $\text{HCO}_3^-$  que se absorbe es responsable del incremento del pH después de una comida. En la cara luminal de la membrana, el  $\text{H}^+$  se secreta hacia el estómago por la acción del transportador  $\text{H}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$  (bomba de protones). El  $\text{Cl}^-$  sigue al  $\text{H}^+$  hacia el interior del estómago, al difundirse por medio de canales de  $\text{Cl}^-$  hacia la membrana luminal (Fig. 8).

Los inhibidores de la bomba de protones (IBP, p. ej., omeprazol), que se utilizan en el tratamiento del reflujo ácido y la úlcera péptica, inhiben la secreción de ácido gástrico al unirse en forma irreversible a los grupos sulfhidrilo de la bomba de protones. La secreción ácida gástrica está regulada mediante la interacción de señales endocrinas, paracrinas y

neuroendocrinas por al menos tres vías principales: (a) gastrina-histamina, (b) CCK-somatostatina y (c) neural, mediante la acetilcolina (ACh) y neuropéptidos.

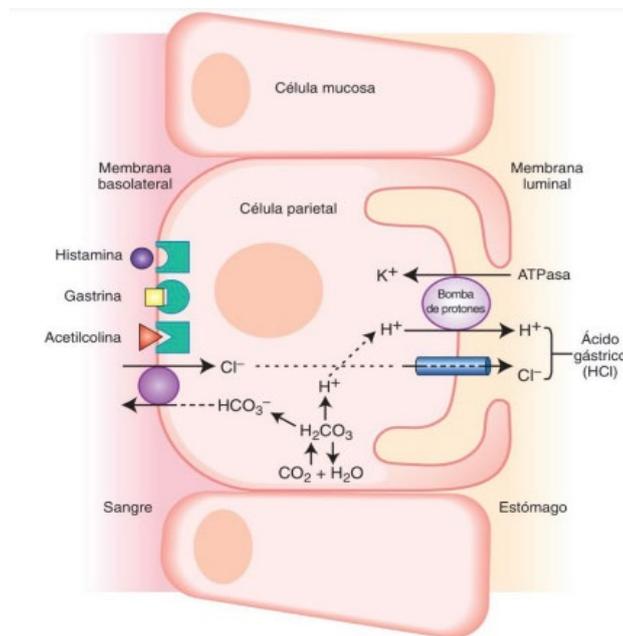


Figura 8. Mecanismo de secreción del ácido gástrico a partir de las células parietales del estómago. Porth Fisiopatología. Alteraciones de la salud. Conceptos básicos. 10ª Ed. (2019).

### Interacción de las vías

La gastrina, por la circulación sanguínea se une a los receptores CCK2 que se expresan en las células parietales y ELC. Su liberación es dependiente del pH gástrico, -un pH alto estimula la secreción mientras que un pH muy ácido la inhibe-, como también el péptido liberador de gastrina (GRP) y la somatostatina, los cuales estimulan e inhiben su liberación, respectivamente.

La interacción de gastrina con CCK2 estimula la producción de segundos mensajeros como el fosfatidil inositol y el calcio, activa la pkC y aumenta la expresión de ARNm de la histidin carboxilasa (HDC), acelerando la liberación y síntesis de histamina, que se unirá a los receptores H2 de las células parietales e inducirá la secreción de ácido. Los antagonistas de los receptores H2 (p. ej., cimetidina), utilizados para el tratamiento de la úlcera péptica y reflujo gastroesofágico, se unen a los receptores H2 e impiden la acción de la histamina. La CCK circulante se une a los receptores CCK1 (células D) que liberan somatostatina, la cual inhibe las células G, las ELC y las parietales, al interactuar con el receptor sst2, inhibiendo la vía gastrina-histamina. La ACh se une a los receptores M3 de las células parietales para estimular la secreción de ácido, y en los M2 y M4 de las células D para inhibirla. Además, la adrenalina y noradrenalina (NA) interactúan con los receptores  $\beta$ 2 de las células ELC movilizand

través de los receptores PAC1 y VAPAC2, respectivamente. La galanina inhibe la vía de la gastrina-histamina, en las células ELC (receptor Gal1).

Cuando la histamina se une a su receptor H2 en la membrana basolateral de las células parietales, induce un aumento del calcio citoplasmático y de los niveles de AMPc, que disparan el eflujo de iones cloruro e hidrogenión de la superficie apical de la célula mediante un canal de conductancia de cloruro y la H-K-ATPasa recién traslocada. En su estado de reposo, las células parietales están llenas de vesículas secretoras que coalescen ante la estimulación para fusionarse con los canalículos que drenan hacia el lumen apical resultando en la secreción de HCl. El cese de la secreción de ácido está asociado a la reinternalización de la bomba de protones, mediado por la cola citoplasmática de la unidad beta de la bomba (Fig. 9).

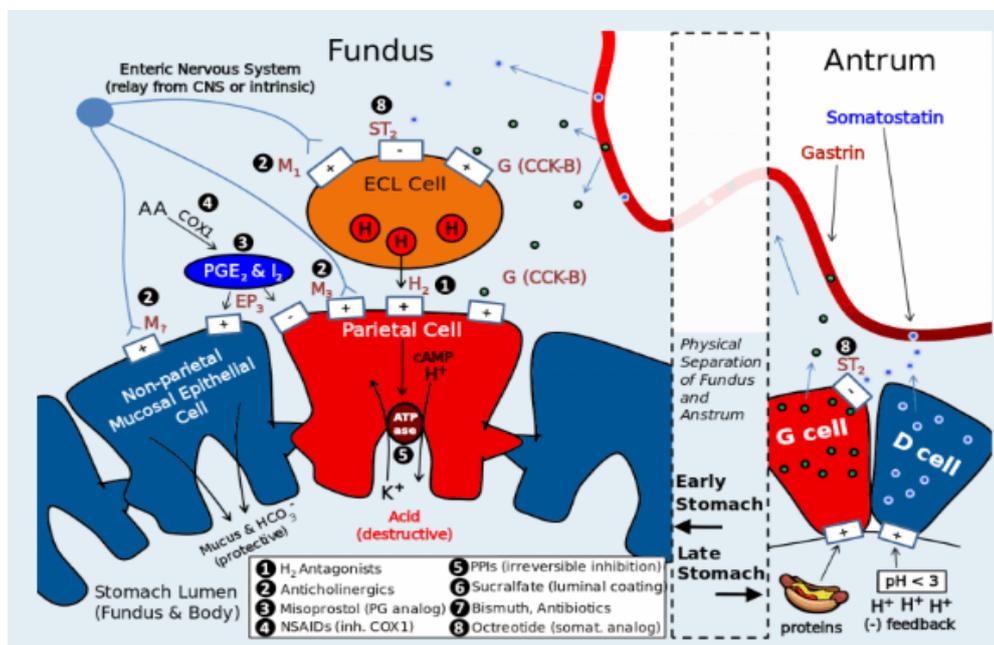


Figura 9. Regulación de la secreción gástrica. Am J PharmTech Res. 2014; 4: 50-68.

Cabe mencionar que en la función de las células parietales además los factores de regulación antes mencionados, participan factores autocrinos como:

Prostaglandinas: inhiben la secreción ácida estimulada por histamina y la liberación de histamina estimulada por gastrina. Son sintetizadas por los macrófagos y las células endoteliales capilares; el factor de crecimiento transformador alfa (TGF-alfa): presente en las células parietales inhibe la secreción ácida gástrica, y el péptido YY: es liberado postprandial desde las células ileales y colónicas e inhibe las fases cefálica y gástrica. Se une a receptores de las células ELC e inhibe la liberación de histamina estimulada por gastrina.

### **Secreciones intestinales**

Las glándulas de Brunner se ubican en el sitio donde el contenido del estómago y las secreciones del hígado y páncreas ingresan al duodeno. La actividad de dichas glándulas recibe influencia del SNA; la estimulación simpática genera una disminución marcada de la producción de moco, lo que deja a esta área más susceptible a la irritación. Como consecuencia, las úlceras son cuatro veces más frecuentes en el duodeno que en el estómago. Además del moco, la mucosa intestinal produce dos tipos de secreciones: 1) líquido seroso (pH, 6,5 a 7,5) que secretan células de las criptas de Lieberkühn, y actúa como vehículo para la absorción; y 2) enzimas de superficie, que facilitan la absorción como por ejemplo las peptidasas (enzimas que separan aminoácidos) y las polisacaridasas (enzimas que escinden los azúcares).

El intestino grueso solo suele secretar moco debido a la intensa actividad del SNA. Por lo general, el intestino no secreta agua o electrolitos, estas sustancias se pierden en grandes cantidades cuando éste se irrita o inflama.

### **Microbiota intestinal**

La microbiota intestinal humana es un ecosistema dinámico y de alta complejidad. Tiene como funciones principales realizar las actividades metabólicas que ahorran energía y recuperar nutrientes absorbibles, generar efectos tróficos sobre las células del epitelio intestinal y proteger al hospedero colonizado de la invasión de microorganismos patógenos.

En la actualidad, se tiene evidencia que la microbiota intestinal es esencial en la función intestinal y en la fisiopatología de diversas enfermedades como la aterosclerosis, obesidad, diabetes, enfermedades inflamatorias intestinales, autoinmunes, cáncer, trastornos neurológicos, entre otros.

El estómago y el intestino delgado contienen pocas especies de bacterias. Esto puede deberse a la composición del contenido luminal (p. ej., ácidos, bilis, secreciones pancreáticas), que elimina la mayor parte de los microorganismos ingeridos, y a los movimientos de propulsión de la región, que impiden su colonización.

El intestino grueso mantiene un ambiente microbiano grande y complejo. Se ha calculado que cada persona tiene entre 300 y 500 especies distintas de bacterias intestinales; entre éstas, las bacterias anaerobias superan en número a las aerobias. La función metabólica principal de la microbiota colónica es la fermentación de los residuos indigeribles de la dieta y del moco endógeno que producen las células epiteliales. También incluye la producción de vitaminas (K, B12, biotina, ácido fólico), la absorción de calcio, magnesio y hierro y, la síntesis de aminoácidos a partir del amoníaco o la urea.

Se reconoce cada vez más el efecto de los probióticos como complemento de la dieta normal y como tratamiento de varias patologías. Son microorganismos vivos que, al

ingerirse, pueden modificar la composición de la microbiota entérica. Entre los probióticos de consumo frecuente se encuentran lactobacilos, bifidobacterias y cepas no patógenas de *Escherichia coli*. Se ha comprobado el valor de los probióticos en la preservación de la remisión de la colitis ulcerosa.

## PRUEBAS PARA EVALUAR LA FUNCIÓN GÁSTRICA

### Características de la secreción gástrica

El jugo gástrico es una solución extremadamente ácida, su pH se encuentra entre 1,5 y 3. Es translúcido, gris claro y ligeramente viscoso y olor acre (aroma áspero y picante al olfato). El volumen residual no excede los 75 mL. En ocasiones las muestras pueden contener un poco de sangre o presentar un color verdoso, marrón o amarillo debido al reflujo de bilis durante el procedimiento de intubación. La aparición de partículas alimenticias es anormal e indica obstrucción. Sus componentes principales son: HCl, FI, moco, PG, lipasa gástrica, sales y agua.

### Aspectos clínicos del análisis gástrico

Conocer la secreción gástrica puede ser de interés en el estudio y tratamiento de algunas patologías y en medicina legal. El uso de las técnicas convencionales se ha reducido debido al desarrollo de nuevas determinaciones bioquímicas y a los estudios de imagen como la endoscopia de fibra óptica con biopsia y procedimientos radiológicos.

Entre los trastornos que producen **hipersecreción** gástrica se incluyen enfermedades tumorales, como el síndrome de Zollinger-Ellison (neoplasia secretora de gastrina, localizada en los islotes pancreáticos) y patologías benignas con alta prevalencia en la población general, como la úlcera duodenal y la enfermedad por reflujo gastroesofágico. A su vez, hay patologías que cursan con **hiposecreción** como en la anemia perniciosa (AP) en adultos (causa más frecuente de anemia megaloblástica). En la AP se observa atrofia gástrica y el estómago no puede secretar el FI que se une a la vitamina B12 para evitar su degradación por el ácido gástrico. El pH del fluido gástrico no disminuye por debajo de 6, incluso a máxima estimulación. La gastritis atrófica, se considera un factor de riesgo para el desarrollo de lesiones malignas (como el adenocarcinoma), y se relaciona con la malabsorción de nutrientes, el sobrecrecimiento bacteriano, neumonías y la infección por *Clostridium difficile*.

## TÉCNICAS DE MEDICIÓN DE LA SECRECIÓN GÁSTRICA

### Aspiración de contenido gástrico y medición de la secreción ácida

Es un método convencional e invasivo. La medición del ácido gástrico se realiza a la mañana y en ayunas, y consiste en la aspiración de contenido gástrico a través de una sonda nasogástrica. Una vez obtenida la muestra gástrica (manualmente con jeringa) se determina el pH titulando con una solución alcalina. A través de estos métodos se puede evaluar la secreción ácida basal (**BAO**, *basal acid output*), es decir en ausencia de estímulos. Las mediciones de la BAO son variables para una misma persona y se relacionan con la actividad motora cíclica gástrica, por ello, los valores de la BAO son poco reproducibles. VR de BAO: 10 mEq/h en hombres y 5 mEq/h en mujeres.

#### Procedimiento:

Antes de la prueba, se deben interrumpir los inhibidores de la bomba de protones (IBP) al menos 14 días y antagonistas de los receptores H<sub>2</sub> durante 3 días.

1. Medir y transferir un volumen de jugo gástrico (p. ej., de 5,0 a 10,0 mL) en un recipiente de titulación. Si el jugo gástrico contiene partículas de comida o moco, se centrifuga la muestra o se filtra a través de una gasa.
2. Determinar el pH de la muestra gástrica con un peachímetro. Si el pH es mayor de 3,5 no hay ácido libre presente. Tal espécimen no necesita ser titulado.
3. Titular la muestra con una solución alcalina (NaOH, 0,10 mol/L, pH de 3,5).

Esta prueba puede indicarse en pacientes con úlcera duodenal y con sospecha de síndrome de Zollinger-Elisson, en el cual se observa un aumento de BAO (15 a 100 mEq/h).

La evaluación de la secreción ácida tras estímulos (análogos de la gastrina como pentagastrina, tetragastrina y péptido liberador de gastrina), es un dato que se correlaciona con la masa de las células parietales. Las pruebas de estímulo ayudan a determinar la secreción ácida máxima (**MAO**, *maximal acid output*), que se refiere a la secreción total de ácido durante la hora siguiente a la estimulación. Se determina sumando los valores obtenidos en muestras recolectadas cada 10 ó 15 min. También es posible calcular el pico de secreción ácida (PAO, *peak acid output*), representativa de la capacidad máxima de secreción. Los VR de MAO, en hombres: 15-40 mEq/h y PAO de 20-45 mEq/h, y en mujeres: MAO de 12-30 mEq/h y PAO de 15-35 mEq/h. La principal desventaja de las pruebas realizadas por métodos convencionales es que infraestiman la acidez gástrica y suelen resultar incómodas para el paciente.

### Técnicas endoscópicas

Existen **métodos cuantitativos** que consisten en aspirar el jugo gástrico bajo visión endoscópica tras la estimulación con pentagastrina/tetragastrina, considerando diferentes

protocolos (dosis de estimulante y períodos de recolección de muestras). Los **métodos cualitativos** utilizan colorantes como el rojo Congo, que cambia de color a pH menor de 3. Se aplica el colorante en la mucosa gástrica tras la estimulación con pentagastrina y el área que cambia de color permite una estimación semicuantitativa de la capacidad de secreción ácida de la mucosa gástrica.

### Determinaciones Bioquímicas

#### - Gastrina

Se analiza en plasma/suero por métodos inmunoquímicos utilizando analizadores automáticos (p. ej. electroquimioluminiscencia) y ELISA. Los anticuerpos presentes en estos ensayos son específicos del carbono terminal biológicamente activo de la molécula de gastrina y tienen una reactividad cruzada mínima con los péptidos CCK. VR gastrina: <100 pg/mL.

-Antes de determinar los niveles de gastrina, el paciente debe estar en ayunas durante 12 h porque la concentración de G34 se duplica y la de G17 se cuadriplica después de una comida, alterando los resultados del ensayo. Las muestras deben congelarse inmediatamente ya que la gastrina es inestable en suero.

-La concentración de la hormona posee un ritmo circadiano, encontrándose niveles bajos entre las 3 am y 7 am, los mayores durante el día y fluctúa fisiológicamente en relación a las comidas. A su vez, los niveles séricos de gastrina aumentan con la edad (a partir de los 60 años de edad), en parte debido a atrofia de la mucosa gástrica.

-Cabe destacar que en la circulación se encuentran diferentes formas moleculares, siendo las principales: G-34 (*big-gastrin*), G-17 (*little gastrin*), ambas con actividad biológica y G-14 (*mini-gastrin*). En casos patológicos (gastritis aclorhidrica o gastrinomas), están presentes las formas moleculares más grandes de gastrina y precursores procesados de manera incompleta.

-La medición de gastrina resulta invaluable en el diagnóstico del síndrome de Zollinger-Ellison (gastrinoma), ya que los valores en ayunas pueden exceder los 1000 pg/mL. En general, la gastrina no aumenta en presencia de úlcera péptica simple. En la mayoría de los pacientes con anemia perniciosa, ocurre un aumento de la gastrina plasmática, que disminuye a los VR cuando se instila de manera artificial HCl en el estómago.

#### - Pepsinógeno (PG)

En un mismo sujeto sano, los niveles de PG se mantienen estables, pero se observa variabilidad entre individuos en función de factores como la edad, altura, peso corporal, dieta, etnia y ritmo circadiano. El PG (PG-I y PG-II) se correlaciona con el estado estructural

y funcional de la mucosa gástrica. El PG-I se asocia con la masa de células principales existentes y el PG-II es secretado por células oxínticas, pilóricas y por el duodeno.

La determinación cuantitativa de los niveles séricos de PG se basa en un inmunoensayo automatizado por detección de quimioluminiscencia o electroquimioluminiscencia. El VR de PG: 60-100 ng/dL. Los niveles séricos elevados corresponden a inflamación de la mucosa gástrica y los niveles bajos se asocian a gastritis crónica, especialmente con atrofia gástrica, y también con metaplasia intestinal y cáncer gástrico. En la actualidad, la principal utilidad clínica es identificar sujetos con atrofia gástrica, que tienen un riesgo mayor de desarrollar cáncer gástrico. La combinación de PG-I y relación PG-I/PG-II bajos se considera un marcador de atrofia hecho que coincide con la atrofia demostrada por biopsia.

#### - Test de aliento de hidrógeno

El estudio del aire espirado es un método que se utiliza para la estimación de varios procesos metabólicos. Para evaluar la acidez gástrica se administra una sustancia por vía oral que reacciona con el ácido gástrico, liberando hidrógeno. Se calcula la cantidad de hidrógeno basal en el aire espirado en ayunas, y luego se administra la sustancia seguida de un estimulante de la secreción gástrica, midiéndose la cantidad de hidrógeno espirado y conociendo de este modo (mediante una resta) la secreción ácida gástrica. Se ha demostrado una correlación aceptable entre los resultados obtenidos con este *test* y los observados con las pruebas de intubación convencionales. Al igual que ocurre con otros *test* no invasivos, no permite detectar cuantitativamente la secreción ácida, pero se ha postulado como una prueba útil para el diagnóstico de aclorhidria.

Se han descrito varias modificaciones a este *test*, que dependen de la sustancia administrada en forma oral, de la utilización de isótopos estables no radiactivos y del protocolo a seguir. Cuando se incorpora  $^{13}\text{C}$  en las moléculas de carbonato de calcio, esta sal reacciona con el HCl del estómago y produce  $\text{CO}_2$  marcado con  $^{13}\text{C}$ . El  $^{13}\text{CO}_2$  es absorbido y eliminado por los pulmones, de forma que, si se mide la relación de  $^{13}\text{CO}_2$  a  $^{12}\text{CO}_2$  en una muestra de aliento, se puede calcular la secreción ácida del estómago, incluso de forma semicuantitativa. La técnica no ha sido validada frente a los *test* convencionales, por lo que no se aplica de forma rutinaria.

## TRASTORNOS GASTROINTESTINALES

### ENFERMEDADES DEL ESTÓMAGO

Como se ha explicado previamente, la secreción ácida está controlada por distintos mecanismos colinérgicos, histaminérgicos y peptidérgicos. Alteraciones en cualquiera de ellos pueden ocasionar una disregulación de la secreción ácida. A continuación se describen las patologías que cursan con hiper- e hiposecreción gástrica y las pruebas bioquímicas que contribuyen al diagnóstico.

### GASTRITIS

La pared gástrica, durante toda la vida, está expuesta al impacto de numerosos factores etiológicos capaces de provocar daño y regeneración de su epitelio (gastropatías) e inflamación histológica de su mucosa (gastritis aguda o crónica) (Fig. 10).

La presencia de gastritis se asocia en algunos casos a erosiones y úlceras en el estómago o en el duodeno. La erosión es una lesión de discontinuidad de la mucosa que no afecta a la muscularis mucosa, y cuando ésta se ve afectada se habla de úlcera. La expresión de enfermedad ulcerosa péptica se utiliza tanto para referirse a las úlceras como a las erosiones del estómago o el duodeno.

#### - GASTRITIS AGUDA

La presentación e instauración de los síntomas siguen un curso agudo. El cuadro clínico que muestran los pacientes es muy variado, desde formas asintomáticas o manifestaciones leves y moderadas (síntomas de dolor en epigastrio, náuseas, vómitos, anorexia y mareos), hasta cuadros graves donde se observa erosión o úlcera mucosa, hemorragias digestivas altas, hematemesis (vómito con sangre fresca), melenas (sangre en las evacuaciones intestinales) o importante síndrome general infeccioso (gastritis flemonosa) con compromiso del estado general. En las personas debilitadas por otra enfermedad asociada, en los niños y ancianos, puede existir una deshidratación y shock si las pérdidas por los vómitos o las diarreas son muy intensas. Las lesiones de la mucosa gástrica se caracterizan por presentar edema y congestión que se limitan al epitelio e infiltrados inflamatorios con predominio de neutrófilos. En la gastritis aguda por la ingestión de cáusticos se evidencia necrosis y lesiones profundas.

#### **Etiopatogenia**

La etiología de las gastritis agudas se corresponde con diversos factores que pueden tener un origen externo o interno. Las **causas exógenas** incluyen las alimentarias, agentes

cáusticos, radiación, alérgicas, fármacos, tóxicos, alcohol, infecciosas (bacteriana o viral), irritantes y mecánicas; y entre las **causas endógenas** se mencionan las metabólicas (uremia), enfermedades sistémicas (EPOC, colagenosis), trastornos del sistema inmunológico, estrés debido a una enfermedad grave (traumatismos), entre otras.

- Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) inhiben la síntesis de prostaglandinas E2 e I2 (dependiente de ciclooxigenasa, COX) que estimulan los mecanismos defensivos.
- La lesión gástrica asociada a la uremia, que afecta a pacientes con infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) secretor de ureasa, puede deberse a la inhibición de los transportadores gástricos de bicarbonato por los iones amonio.
- Una menor secreción de bicarbonato y mucina evidencia la mayor sensibilidad a la gastritis de los ancianos.
- La hipoxemia y el menor aporte de oxígeno pueden explicar el aumento de la incidencia de gastropatía y gastritis en zonas altitudinales.
- La ingesta de sustancias químicas potentes (ácidos o álcalis), produce una lesión grave de la mucosa como consecuencia del daño directo de las células epiteliales y estromales.

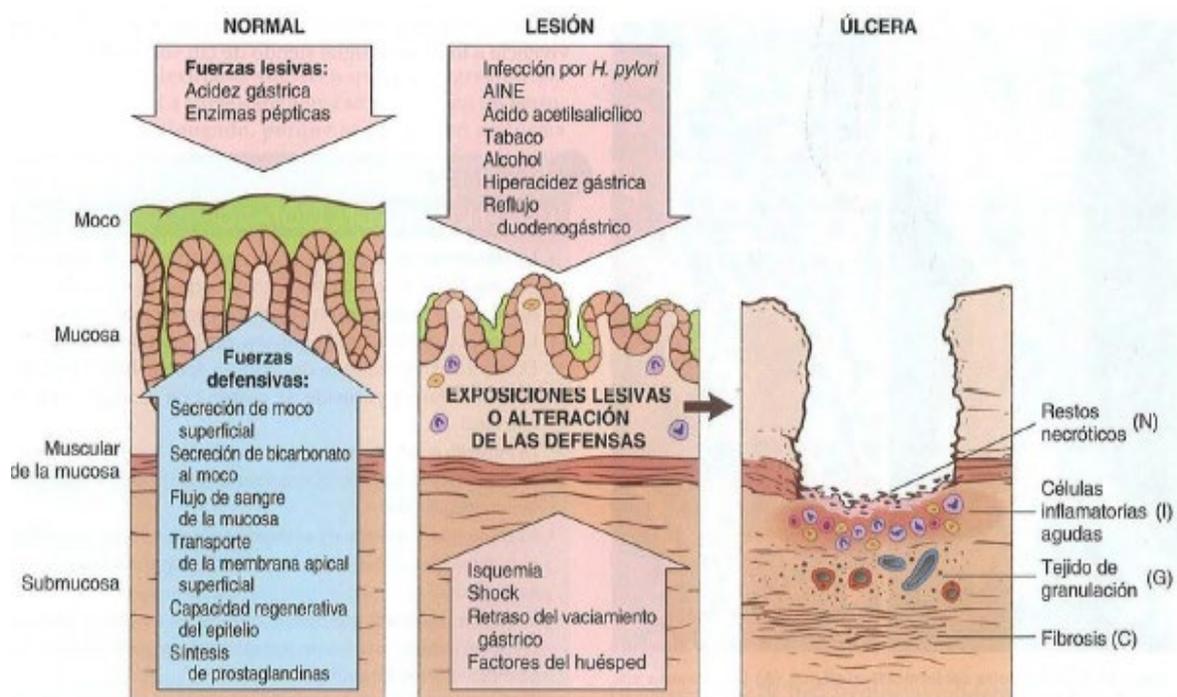


Figura 10. Mecanismos de la lesión y protección gástrica. En este diagrama se representa la progresión de las formas más leves de ulceración que pueden asociarse a gastritis aguda o crónica. Entre las úlceras se encuentran capas de restos necróticos (N), inflamación (I) y tejido de granulación (G); la cicatrización (C), que se desarrolla con el tiempo, aparece solo en las lesiones crónicas. AINE, antiinflamatorio no esteroideo (Robbins. Patología humana, 10ª Ed., 2018).

## - GASTRITIS CRÓNICA (GC)

Es una entidad independiente de la gastritis aguda y se presenta por una inflamación inespecífica de la mucosa gástrica de evolución progresiva. Se caracteriza por la ausencia de erosiones macroscópicas y la presencia de cambios inflamatorios crónicos que, de forma eventual, llevan a atrofia del epitelio glandular estomacal. Dentro de las GC, la causa más frecuente es la infección por el bacilo *H. pylori*. La gastritis atrófica autoinmunitaria representa alrededor del 10%, aunque se manifiesta en pacientes no infectados por *H. pylori*. En tercer lugar, se ubica el consumo crónico de AINES, y otras causas menos habituales son la lesión por radioterapia y el reflujo biliar crónico.

Los signos y síntomas asociados a la GC son menos graves y más persistentes que los de una gastritis aguda. Pueden aparecer náuseas y molestias abdominales altas, a veces con vómitos. Dado que la GC no tiene una clínica específica, se debe efectuar un diagnóstico diferencial con la úlcera péptica, litiasis biliar y hernia de hiato (protrusión del estómago a través del hiato diafragmático, en general son asintomáticas, pero la mayor incidencia de reflujo ácido puede provocar síntomas de ERGE).

### 1- Gastritis por *Helicobacter pylori*

La infección gástrica por *H. pylori* tiene una prevalencia variable a nivel mundial, tanto en la población adulta como en niños. Cuando las bacterias Gram negativas colonizan el estómago, liberan sustancias químicas que atraviesan la mucosa gástrica, atraen fagocitos, leucocitos y macrófagos y generan una GC. En las muestras de biopsia gástrica se evidencian bacilos curvos o espirilados, microaerófilos y flagelados (Fig. 11). Su transmisión es interhumana, por vía fecal-oral u oral-oral.

La infección aguda por *H. pylori* es subclínica, se manifiesta con síntomas de dispepsia o dolor o malestar en la mitad superior del abdomen. Por causa de la GC a nivel del antro, se inhibe la secreción de somatostatina que conlleva un aumento de secreción de gastrina y HCl, provocando una enfermedad ulcerosa péptica duodenal o gástrica. En algunos individuos la infección progresa y afecta al cuerpo y el fondo del estómago, reduciendo la masa de células parietales y provocando hipoclorhidria, con hiperplasia secundaria de las células G e hipergastrinemia. Además, la extensión de la gastritis a dichas zonas se relaciona con un aumento en el riesgo a desarrollar adenocarcinoma gástrico y de producción de tejido linfoide asociado a la mucosa, que puede evolucionar a linfoma. Se ha observado que alrededor del 80% de los pacientes con linfoma MALT (tejido linfoide asociado a mucosas) presentan infección por *H. pylori*, como así también los individuos con púrpura trombocitopénica inmune. La erradicación de la bacteria logra la regresión de la lesión en la mayoría de los linfomas localizados en el estómago o los pacientes tienen mejor respuesta plaquetaria, respectivamente, siendo una parte fundamental del tratamiento. Dado

que la infección por *H. pylori* puede contribuir a hipergastrinemias, se recomienda repetir la determinación de gastrina sérica 6 meses después del tratamiento.

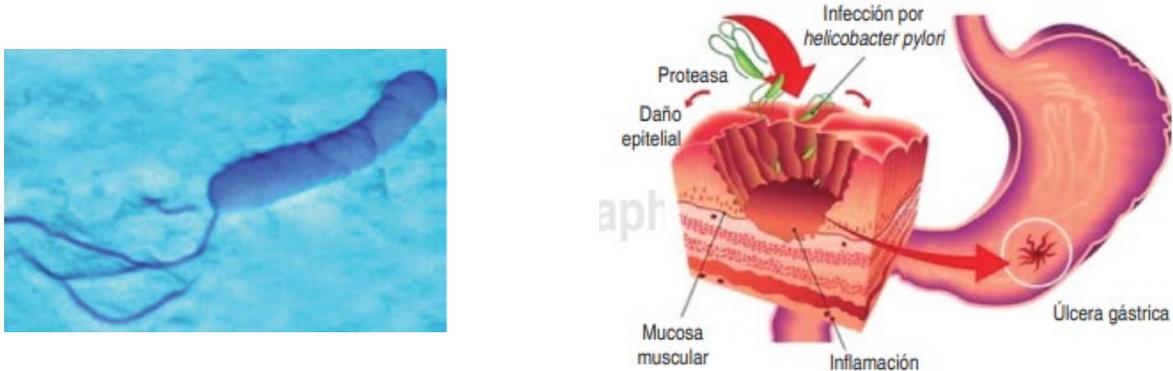


Figura 11. A) *Helicobacter pylori* y flagelos. B) Desarrollo de la infección por *H. pylori* (úlceras gástricas). Rev Latinoam Patol Clin Med Lab 2016; 63: 100-109.

### Patogenia

El *H. pylori* se ha adaptado al nicho ecológico generado por el moco gástrico pero se desconoce qué contribución tiene dicha invasión a la patogenia de la enfermedad. Cinco rasgos determinan su virulencia y hacen que se considere un carcinógeno tipo I (Organización Mundial de la Salud) en el desarrollo de cáncer gástrico:

- Flagelos, que permiten a las bacterias moverse en el moco viscoso.
- Ureasa, que genera amoníaco a partir de la urea endógena, de forma que incrementa el pH gástrico local alrededor de los gérmenes y los protege del pH ácido gástrico.
- Adhesinas, que aumentan la adherencia de las bacterias a las células foveolares superficiales.
- Enzimas con capacidad para interferir con la protección local de la mucosa gástrica, generar inflamación e inducir respuesta inmunitaria con aumento de citoquinas proinflamatorias (interleuquina [IL] 6, IL-8).
- Toxinas, como la que codifica el gen asociado a citotoxina A (*CagA*) y la citotoxina vacuolizante (*VacA*) implicadas en el desarrollo de úlceras o cáncer.

Todos estos factores permiten que la bacteria provoque un desequilibrio entre las defensas de la mucosa gastroduodenal y las fuerzas lesivas. La erradicación de la bacteria ha demostrado disminuir la incidencia del cáncer gástrico.

### Diagnóstico por el laboratorio

En la gastritis aguda y en la GC no suele haber alteraciones bioquímicas relevantes. El diagnóstico definitivo de esta patología se establece mediante la toma de biopsias en un estudio endoscópico.

El diagnóstico de la infección por *H. pylori* se puede realizar de varias maneras:

### **Pruebas directas/invasivas (en biopsia obtenida mediante endoscopia)**

- Endoscopía gastrointestinal es un procedimiento usado para observar el revestimiento de la parte superior del aparato digestivo e investigar posibles cambios que pueden provocar afecciones como una úlcera péptica, neoplasias o gastritis por *H. pylori* u otros problemas digestivos. Durante el examen, el médico introduce por la boca del paciente (bajo sedación) un tubo delgado, largo y flexible, equipado con una cámara (endoscopio), que atraviesa la garganta y el esófago hasta llegar al estómago y a la primera parte del intestino (duodeno). Con este instrumento se toman muestras de tejido del antro y/o del cuerpo gástrico (biopsia) y en ellas se pueden realizar: estudio histológico, cultivos bacterianos, prueba de ureasa rápida y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar el ADN bacteriano.

#### **- Estudio Histopatológico**

Permite de manera sencilla la identificación de la bacteria a través de tinciones supravitales (hematoxilina-eosina, tinción de Giemsa, PAS-AB *-periodic acid Schiff-Alcian blue-*, otras) que, acompañadas de marcadores fluorescentes garantizan una mayor sensibilidad y especificidad (98 y 100% respectivamente). La técnica histológica tiene la ventaja que además de pesquisar la presencia de *H. pylori*, permite evaluar el estado de la mucosa gástrica y detectar si hay atrofia gástrica o metaplasia intestinal.

#### **- Cultivo**

Es útil cuando no se ha logrado la erradicación de la bacteria y se desea evaluar la sensibilidad a diferentes antibióticos y orientar la terapia posterior. Para efectuar el aislamiento de *H. pylori* se han utilizado varios medios de cultivo, entre ellos, la base de agar Columbia suplementado con un 7% de sangre y antibióticos (trimetoprima, vancomicina, cefsulodina y anfotericina B). Este microorganismo requiere una atmósfera de microaerofilia, alta humedad, temperatura de 35-37 °C y un tiempo de incubación de 5 a 10 días.

#### **- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Es un método diagnóstico que detecta ácido desoxirribonucleico (ADN) de *H. pylori* en concentraciones mínimas, a partir de biopsias gástricas, y también la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos (claritromicina y/o levofloxacina). Existen diferentes genes que pueden evaluarse como ureA, ureC, 16SrRNA, 23SrRNA y Hsp60. El gen *glmM* ha sido el más empleado para el diagnóstico y presenta un 100% de sensibilidad. Por otra parte, con la PCR en tiempo real puede medirse la carga bacteriana, la cual es mayor en pacientes con gastropatía nodular.

- Prueba rápida de ureasa

Es una técnica cualitativa que determina la actividad de la enzima ureasa en una muestra de mucosa gástrica, y solo detecta infección activa y no infección pasada. Consiste en colocar la pieza de biopsia en un tubo con urea y, mediante la acción de la ureasa, se hidroliza y forma CO<sub>2</sub> y amoníaco, generando un pH alcalino, que se detecta mediante un cambio colorimétrico (Fig. 12). La especificidad y sensibilidad de la prueba es del 95%, pueden existir falsos negativos en pacientes que toman inhibidores de la bomba de protones (IBP), antagonistas H<sub>2</sub>, antibióticos o compuestos que contienen bismuto.

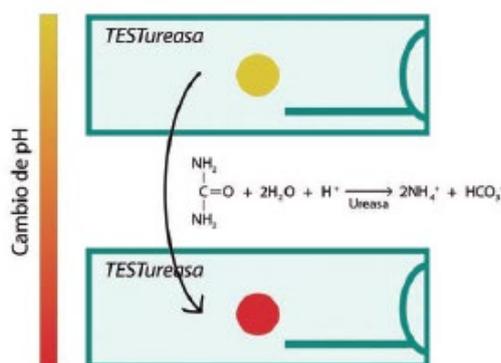


Figura 12. Mecanismo de acción de la prueba rápida de ureasa. Acta Gastroenterol Latinoam 2022; 52: 36-46.

**Pruebas indirectas/no invasivas**

- Test del aliento con urea marcada o *Breath test*

La prueba de aire espirado es un método efectivo para el diagnóstico de *H. pylori* y para confirmar la erradicación de la bacteria una vez terminado el tratamiento antibiótico. Se administra vía oral urea con carbono marcado (puede ser un isótopo radioactivo, <sup>14</sup>C, o no radioactivo, <sup>13</sup>C), que se hidroliza por la enzima ureasa de *H. pylori* para producir amoníaco y CO<sub>2</sub>, el cual difunde a través de la mucosa para ser eliminado a través de los pulmones (Fig. 13), permitiendo así su medición.

Procedimiento: Se realiza durante la mañana luego de un ayuno al menos de 8 h. La prueba se inicia con la recolección de una muestra del aliento (basal) haciendo que la persona respire en una bolsa o recipiente. A continuación, se le indica que ingiera un comprimido de urea marcada con <sup>13</sup>C y luego de 30 min se toma la segunda muestra de aire espirado, el cual queda atrapado en hidróxido metanólico de hiamina. El cambio de color del indicador (azul de timol) indica la cantidad de CO<sub>2</sub> marcado que ha sido atrapado y se mide en un espectrofotómetro de masa. Si la segunda muestra de aliento tiene niveles elevados de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> respecto al basal, indica presencia de *H. pylori*. La sensibilidad y la especificidad de esta técnica son superiores al 90%, y los resultados falsos negativos, de forma similar a lo que ocurre en las pruebas directas, pueden ser observados en pacientes en tratamiento

con IBP, bismuto o antibióticos. Dentro de los falsos positivos, se incluyen otras bacterias portadoras de ureasa que pueden estar en la boca o el intestino, tales como *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Staphylococcus aureus*.

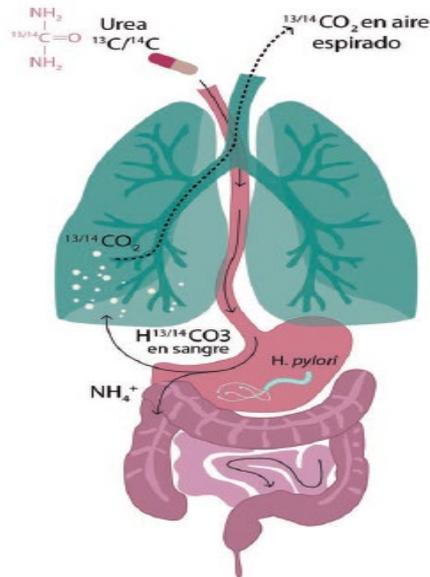


Figura 13. Mecanismo de detección de prueba de aire espirado con urea marcada con  $^{13}\text{C}$  ó  $^{14}\text{C}$ . Adaptado. Acta Gastroenterol Latinoam 2022; 52: 36-46.

#### - Serología

Se basa en la utilización de la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para la determinación y cuantificación de anticuerpos IgG anti-*H. pylori*, la cual posee alta sensibilidad (>90%) y especificidad (85-95%). Los anticuerpos se determinan en suero contra distintas proteínas de *H. pylori*, tiene la limitación de que un resultado positivo puede no indicar efectivamente una infección actual, ya que los títulos pueden mantenerse incluso en pacientes en los que ya fue erradicada la bacteria, y también porque podría haber reactividad cruzada con otros microorganismos, lo que hace que la especificidad sea menor. Los estudios serológicos están dirigidos a identificar anticuerpos específicos tipo IgM, IgA, IgG CagA anti-*H. pylori*, ya que el antígeno CagA muestra una correlación entre el cáncer gástrico e infección por la bacteria.

#### - Detección del antígeno de *H. pylori*

Es una herramienta útil que logra la detección de antígenos de *H. pylori* en muestras de materia fecal mediante inmunoensayos enzimáticos (ELISA) o cassette inmunocromatográfico, utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales. Es posible realizar el diagnóstico de infección previo a la terapia y confirmar la efectividad del tratamiento en comparación con la endoscopía digestiva alta o la prueba de aire espirado.

Es necesario que la muestra de materia fecal no esté contaminada por líquidos, se utilice dentro de pocas horas de su recolección y se conserve a 4-8°C, antes del estudio. Hay que tener precaución en pacientes que estén cursando un cuadro diarreico, ya que podría reducirse la concentración antigénica como también con la ingestión de antibióticos (cuatro semanas), para evitar falsos negativos. Debe suspenderse la toma de IBP (dos semanas) ya que disminuye la sensibilidad del antígeno en deposiciones de *H. pylori*.

- Determinación de péptidos: pepsinógenos (PG)

La concentración sérica de PGI y PGII se determina por ELISA. Se observa un aumento de PG en los individuos con GC relacionada con la infección de *H. pylori*, de modo que el aumento de PGII sérico resulta, en proporción, mayor que el de PGI y se correlaciona con el grado de inflamación gástrica.

## 2- Gastritis autoinmune

La gastritis autoinmune (GAI) o gastritis crónica atrófica tipo A, es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta la mucosa del cuerpo y fondo del estómago.

### Etio-Patogenia

La causa de la GAI todavía no es bien conocida, aunque participarían factores genéticos y ambientales en su desarrollo y puede asociarse con una infección crónica por *H. pylori*.

La GAI se caracteriza por la producción de anticuerpos contra las células parietales u oxínticas que generan su destrucción y en consecuencia un estado de hipoclorhidria y posterior aclorhidria con un aumento del pH a nivel gástrico. Esta disminución de la acidez puede generar déficit de hierro por malabsorción. A su vez, la producción FI está disminuída por la producción de anticuerpos anti-factor intrínseco (AFI), lo cual imposibilita la absorción de vitamina B12 en el íleon y en consecuencia la deficiencia de esta vitamina ocasiona anemia perniciosa. La ausencia de retroalimentación negativa por las células parietales induce hiperplasia de las células G a nivel antral, incrementa la secreción de gastrina y estimula directamente las células enterocromafines induciendo su proliferación, hiperplasia y eventual displasia y desarrollo de tumores neuroendocrinos. Concomitantemente se produce una disminución del PG I que es producido a nivel corporal, por lo tanto se ha planteado emplear la relación entre el pepsinógeno I y II ( $< 3$ ) para el diagnóstico de GAI (Tabla 2 y Fig. 14).

Tabla 2. Características de las gastritis asociada a *Helicobacter pylori* y autoinmunitaria.

Característica	Asociada a <i>H. pylori</i>	Autoinmunitaria
Localización	Antro	Cuerpo
Infiltrado inflamatorio	Neutrófilos, células plasmáticas subepiteliales	Linfocitos, macrófagos
Producción de ácido	De aumentada a ligeramente reducida	Reducida
Gastrina	De normal a muy aumentada	Muy aumentada
Otras lesiones	Pólipos hiperplásicos/inflamatorios	Hiperplasia neuroendocrina
Serología	Anticuerpos contra <i>H. pylori</i>	Anticuerpos contra las células parietales (H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPasa, factor intrínseco)
Secuelas	Úlcera péptica, adenocarcinoma, linfoma	Atrofia, anemia perniciosa, adenocarcinoma, tumor carcinoide
Asociaciones	Bajo nivel socioeconómico, pobreza, residencia en áreas rurales	Enfermedad autoinmunitaria; tiroiditis, diabetes mellitus, enfermedad de Graves

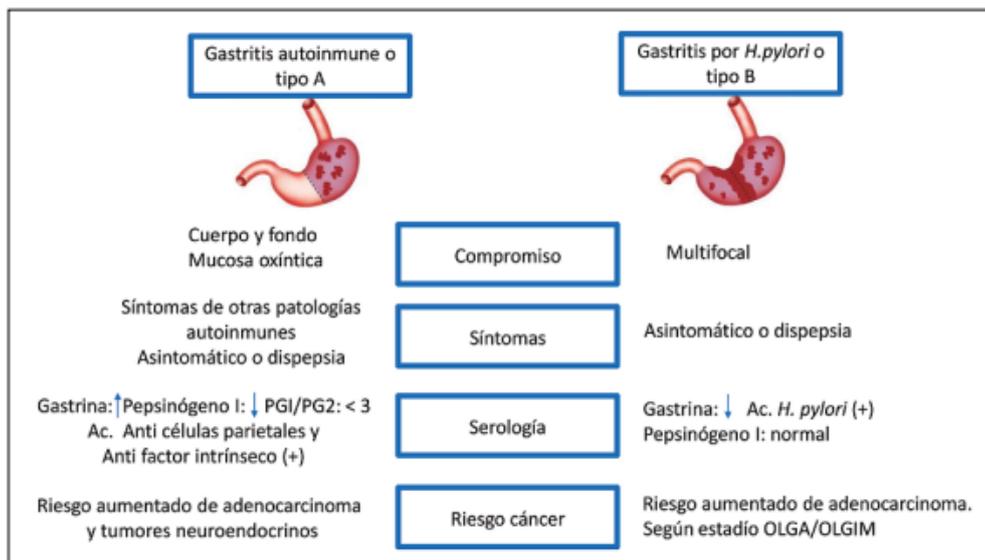


Figura 14. Tipos de gastritis crónica atrófica. Gastroenterol. Latinoam 2019; 30:13-20.

### Características clínicas

La GAI presenta un amplio espectro de manifestaciones tanto digestivas, hematológicas y neurológicas. Con frecuencia se la relaciona con trastornos autoinmunitarios como tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, enfermedad de Graves, diabetes tipo 1 y enfermedad celíaca, entre otras. La anemia por déficit de vitamina B12 presenta alteraciones en los exámenes de laboratorio (macrocitosis, hipersegmentación de neutrófilos, aumento de LDH, etc), las manifestaciones neurológicas van desde variaciones de la sensibilidad hasta alteraciones neuropsiquiátricas (depresión, trastornos obsesivos compulsivos, psicosis, demencia). Se recomienda que los pacientes con anemia por déficit de hierro de causa desconocida sean estudiados buscando el diagnóstico de GAI, así como el de enfermedad celíaca.

Estudios diagnósticos

Se recurre a varios exámenes para su confirmación, tanto endoscópicos y biopsias como de laboratorio, entre ellos:

- Determinación de anticuerpos anti células parietales (AACP): es adecuada para la detección de GAI y AP. Poseen una sensibilidad alrededor de 80%, pero baja especificidad. Su presencia no es suficiente para el diagnóstico, porque no son específicos para la AP, ya que se encuentran en la circulación de individuos con otras enfermedades tales como diabetes tipo 1 (DM1), enfermedades tiroideas autoinmunes, vitiligo y enfermedad celíaca.

- Determinación de anticuerpos anti factor intrínseco (AFI) tienen una sensibilidad del 50%, pero mayor especificidad. En pacientes con AP y AFI negativos, la seroconversión puede ocurrir más tarde en el curso de la enfermedad.

- Evaluación de los niveles séricos de gastrina y de pepsinógeno. Cuando los niveles de PGI y la relación PGI/PGII disminuyen (valores séricos de PGI <25ug/L y relación PGI/PGII < 3), se sospecha de una GC atrófica del cuerpo-fondo de grado moderado-grave y se proponen como valores límites para la detección de cáncer gástrico (Fig.15).

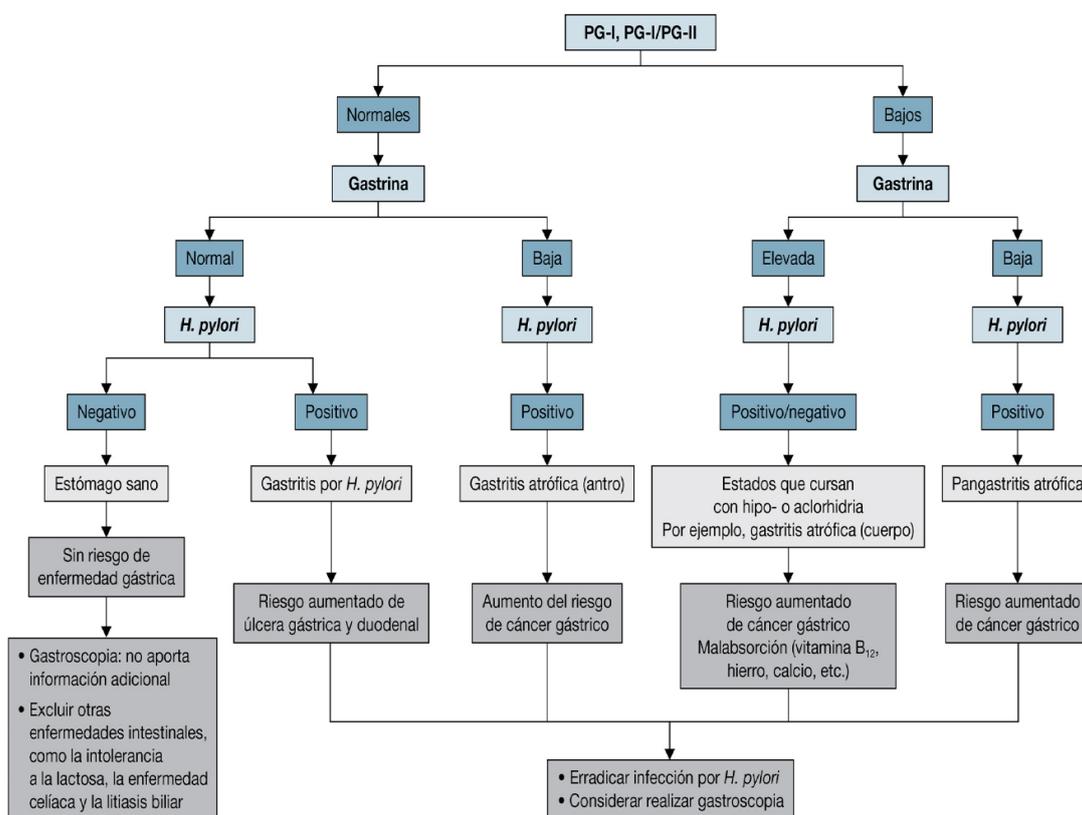


Figura 15. Indicación de gastroscopia en función de un panel de marcadores: pepsinógeno (PG), gastrina sérica y anticuerpos IgG anti-*H. pylori*. Balcells. 23ª Ed (2019).

- Endoscopia, es necesaria la sospecha de atrofia. El diagnóstico se establece cuando existe histología compatible, es decir atrofia predominante del cuerpo y fondo gástrico, asociado a AACP y/o AFI positivos.

La importancia del seguimiento se funda en el desarrollo de neoplasias gástricas neuroendocrinas tipo 1, y del incremento de la incidencia de adenocarcinoma gástrico. Así, el alcance de esta neoplasia se ha estudiado en relación con la carcinogénesis asociada a *H. pylori* y el desarrollo de metaplasia intestinal de las células caliciformes que expresan marcadores intestinales incluyendo Muc2 y Trefoil factor 3 (TFF3).

### 3- Úlcera Péptica

Es una complicación de la GC. Se trata de una lesión limitada a la mucosa que penetra en la *muscularis mucosae* y afecta a áreas expuestas al ácido y a la pepsina. Si bien las capas de la mucosa que cubren a la capa de músculo cicatrizada pueden regenerarse, este proceso es a menudo imperfecto, y propicia el desarrollo de episodios recurrentes de ulceración. Las úlceras duodenales son más frecuentes que las gástricas.

Los principales factores etiológicos implicado en la úlcera péptica es la infección por *H. pylori* y el consumo de AINES, ya que ambos comprometen los mecanismos protectores de la mucosa gástrica de los efectos destructivos del ácido corrosivo de manera continua.

En la úlcera duodenal tiene importancia la hipersecreción de HCl que condiciona un pH bajo en el bulbo duodenal. Tanto el incremento de la masa de células parietales, como una excesiva respuesta a los estímulos, principalmente por la liberación de gastrina, contribuyen a elevar la secreción ácida como también el vaciamiento rápido del estómago, con neutralización deficiente del jugo gástrico o por una producción insuficiente de bicarbonato por el páncreas. La lesión por ácido en el duodeno puede derivar en metaplasia gástrica, permitiendo al microorganismo colonizar estas regiones y promover el desarrollo de las úlceras duodenales. Las úlceras inducidas por AINES implican la lesión de la mucosa y la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

Las complicaciones más frecuentes de la úlcera péptica son la hemorragia, la perforación y la penetración, así como la obstrucción de la salida gástrica. La hemorragia se debe al sangrado del tejido de granulación o a la erosión de una arteria o vena en el lecho ulceroso. La evidencia de la hemorragia pueden ser la hematemesis (vómito con sangre) o la melena. La hemorragia puede ser súbita, intensa y presentarse sin aviso previo, o insidiosa y generar tan sólo la presencia de sangre oculta en las heces. La hemorragia aguda se evidencia por el desarrollo súbito de debilidad, mareo, sed, piel fría y húmeda, deseo de defecar, y evacuación de heces semidiarreicas. Cuando la úlcera se perfora, el contenido GI ingresa al peritoneo causando peritonitis.

### Laboratorio

- La analítica suele ser normal, aunque en ocasiones se observa en el hemograma una anemia hipocrómica que guarda relación con pérdidas sanguíneas de distinta intensidad, puede acompañarse por leucocitosis con neutrofilia (úlceras complicadas por perforación).

- El estudio de sangre oculta en heces puede ser positivo. Si la hemorragia es de mayor intensidad, las heces son características (melenas) por su color (negras), textura (pastosas) y olor (fétidas).

- En el estudio de secreción gástrica en pacientes con úlcera duodenal se observa que la secreción basal y el pico máximo de secreción ácida tras la estimulación con pentagastrina son superiores a los de los sujetos normales, mientras que en la úlcera gástrica se encuentran iguales o disminuidos. Existe buena correlación entre la concentración sérica de PG I y la secreción ácida máxima (MAO) tras la estimulación con pentagastrina. El 50% de los pacientes con úlcera duodenal tienen niveles de PG I elevados.

### Síndrome de Zollinger-Ellison (ZE)

Es una condición poco frecuente que genera un tumor secretor de gastrina (gastrinoma) que se suele localizar en el páncreas o en la pared duodenal. El gastrinoma es un tumor de células de captación y descarboxilación de precursores de grupos amino (APUD, *amine precursor uptake decarboxilase*) caracterizado por hipersecreción ácida, úlceras múltiples y la existencia de una tumoración, generalmente pancreática, de células no beta secretoras de gastrina. Como resultante de la hipergastrinemia su expresión clínica se caracteriza por síndrome ulceroso péptico, enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) y diarrea; y el hiperparatiroidismo es la endocrinopatía más frecuente. La diarrea puede derivar de la secreción excesiva de ácido o de la inactivación de la lipasa intestinal y de las anomalías de la digestión de las grasas que se presentan cuando disminuye el pH intestinal.

Esta entidad se debe sospechar ante la presencia de úlceras múltiples y/o en localizaciones atípicas, como en la segunda porción duodenal, refractarias al tratamiento, y en pacientes con antecedentes familiares. La hipergastrinemia también puede observarse en un trastorno autosómico dominante denominado síndrome de neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (NEM-1), resultado de una mutación inactiva del gen *NEM 1* que codifica la proteína nuclear menina. Se caracteriza por desarrollar numerosas neoplasias endocrinas como hiperparatiroidismo y tumores endocrinos múltiples, gastrinomas, entre otros. Entre el 20% y el 25% de los gastrinomas se deben al NEM-1.

### Laboratorio

El diagnóstico del síndrome de ZE se basa en la elevación de la gastrina sérica (VR: <100 pg/mL) y de las concentraciones basales de ácido gástrico, especialmente con valores

de pH gástrico <3, son sugerentes de un gastrinoma. Valores superiores a 1.000 pg/mL se consideran diagnósticos de la enfermedad (ZE).

Para diferenciar entre gastrinoma y otras causas de hipergastrinemia se realiza el test de estimulación con secretina. Esta hormona induce la secreción de gastrina por las células del gastrinoma, de forma que en los pacientes con este tipo de tumores incrementa la gastrina sérica en respuesta a una infusión de secretina. En contraste, las células G normales gástricas son inhibidas por la secretina y, por tanto, las concentraciones de gastrina sérica no se elevan en otras causas de hipergastrinemia.

El test consiste en la medición basal de los niveles séricos de gastrina y a los 15 min tras la administración intravenosa de secretina (2 U/kg en 10 mL de suero fisiológico). Un incremento de gastrina mayor de 200 ng/L en respuesta a la infusión de secretina, se considera una prueba positiva, la cual tiene una sensibilidad y una especificidad del 94 y el 100%, respectivamente, para el diagnóstico de gastrinoma.

El estudio del quimismo gástrico fue durante muchos años fundamental para establecer el diagnóstico del síndrome de ZE, una secreción basal superior al 60% del PAO, es un criterio diagnóstico de gran especificidad.

Otros estudios:

- Establecer el diagnóstico diferencial con síndrome de NEM-1(estudios genéticos, moleculares y clínicos).
- De imágenes: tomografía por emisión de positrones (PET) es actualmente la técnica de elección para el diagnóstico de los tumores del sistema APUD (sistema neuroendocrino difuso). Otras: tomografía computada, ecografía abdominal y la angiografía selectiva se utilizan para localizar el tumor y determinar si existe enfermedad metastásica.

## POLIPOS Y TUMORES GASTRICOS

Los **pólipos gástricos** son lesiones reactivas asociadas a GC. Son masas o nódulos que se proyectan por encima de la mucosa circundante y se describen hasta en el 5% de las endoscopias digestivas altas. Los pólipos pueden aparecer como consecuencia de la hiperplasia de células epiteliales o del estroma, por inflamación, ectopia o neoplasia.

### **Adenocarcinoma gástrico**

Es el tumor maligno más frecuente del estómago, deriva del tejido glandular gástrico y representa más del 90% de todos los cánceres gástricos. Los adenomas gástricos se desarrollan asociados a GC y se relacionan con la metaplasia intestinal y con la atrofia de la mucosa (glandular). La mayor parte se detectan una vez que aparecen síntomas (dolor abdominal, dispepsia, pérdida de peso, hemorragia digestiva alta, vómitos, etc.), siendo ya

generalmente una enfermedad avanzada e incurable, con existencia de enfermedad metastásica en más de la mitad de los casos.

Los adenocarcinomas gástricos se clasifican en función de la localización y del aspecto macroscópico e histológico. Los que tienen un patrón histológico intestinal suelen formar tumores voluminosos y pueden ulcerarse, mientras que los constituidos por células en anillo llenas de moco tienen un patrón de crecimiento infiltrante difuso, que puede engrosar la pared gástrica (linitis plástica) sin dar lugar a una masa definida.

*H. pylori* es el agente etiológico más frecuente implicado en el adenocarcinoma gástrico, aunque se describen otras asociaciones, como la gastritis crónica atrófica y la infección por el virus de Epstein Barr, señalando que existen distintas vías de transformación neoplásica.

### **Laboratorio**

En el estudio del jugo gástrico suele existir una disminución de la acidez (hipoclorhidria o aclorhidria) debido a la presencia de atrofia gástrica. En el caso de que el adenocarcinoma se implante sobre una úlcera gástrica, la acidez puede ser normal, por lo que el análisis del quimismo gástrico tiene un valor limitado.

En el hemograma se detecta anemia, que puede ser hipo- o normocrómica; la velocidad de sedimentación globular (VSG) suele estar aumentada y puede existir hipoalbuminemia. La alteración de las pruebas de función hepática sugiere afectación metastásica del hígado. Los marcadores tumorales como el antígeno carcinoembrionario (CEA), el CA-125 y el CA-72.4 (más específico en el cáncer gástrico) suelen estar elevados (Ver Marcadores Tumorales, guía de TP de BCI parte 2).

La endoscopia es la técnica de elección para su diagnóstico, ya que permite la visualización de la lesión y la obtención de tejido para el diagnóstico anatomopatológico.

## **ASPECTOS CLINICOS-PATOLOGICOS DE LA FUNCION INTESTINAL**

El intestino delgado y el colon son las zonas origen de una amplia variedad de enfermedades, muchas de las cuales afectan al transporte de nutrientes y agua. Las alteraciones de estos procesos pueden ocasionar malabsorción y diarrea. Los intestinos son el principal lugar de interacción entre el sistema inmunitario y los antígenos presentes en los alimentos y la microbiota intestinal. Ésta es muy sensible a la dieta, hecho que podría explicar la asociación entre la alergia alimentaria y otras enfermedades inducidas por la dieta y alteraciones en la microbiota. Los recientes avances científicos aportados por estudios moleculares, han permitido definir la composición y diversidad de la microbiota intestinal, que en gran parte no se puede cultivar.

Entre las condiciones que generan anomalías en la función intestinal se encuentran el síndrome de intestino irritable (SII), la enfermedad intestinal inflamatoria (EII), la diverticulitis, la apendicitis, los trastornos de la motilidad intestinal (p. ej., diarrea, constipación y obstrucción intestinal), el síndrome por malabsorción y los cánceres de colon y recto.

## ENFERMEDADES DEL INTESTINO

### - Síndrome del intestino irritable (SII)

El SII es una alteración en el funcionamiento del tubo digestivo caracterizada por una combinación variable de síntomas intestinales crónicos y recurrentes que no se explican por anomalías estructurales o bioquímicas. Se presentan manifestaciones persistentes de dolor abdominal, trastornos de la función intestinal y otros malestares como flatulencias, distensión abdominal, náuseas y anorexia, estreñimiento o diarrea, y ansiedad o depresión. La característica principal es el dolor abdominal (intermitente, tipo cólico y se ubica en el abdomen inferior) que se alivia al defecar y se relaciona con cambios en la consistencia o la frecuencia de las heces. No suele presentarse durante la noche o interferir con el sueño. Se considera que esta condición se debe a una desregulación de la actividad motora intestinal y las funciones nerviosas, controladas por el SNC. Las personas con SII experimentan aumento de la motilidad y contracciones intestinales anómalas en respuesta a situaciones de estrés psicológico y fisiológico. Las mujeres suelen ser más afectadas que los hombres.

Debido a la falta de marcadores anatómicos o fisiológicos para el SII, el diagnóstico se basa en la presencia de los signos y síntomas antes mencionados. Además, se destaca un incremento en la frecuencia de evacuaciones (más de 3 veces/día o menos de 3 veces/semana) y la forma de las heces (escíbalos/induración o semidiarreicas/acuosas), las anomalías que se presentan durante la defecación (pujo, urgencia o tenesmo), la expulsión de moco y la distensión abdominal.

Es importante considerar los antecedentes de intolerancia a la lactosa o a otros azúcares, ya que puede ser un factor precipitante en algunas personas. El inicio agudo de los síntomas sugiere la presencia de enfermedad orgánica, al igual que la pérdida ponderal, anemia, fiebre, sangre oculta en heces, síntomas nocturnos o malabsorción. En esta situación se hace necesaria una valoración adicional de los diagnósticos diferenciales.

## ALTERACIONES DE LA MOTILIDAD INTESTINAL

### Procesos que cursan con Diarrea

La diarrea se define como el aumento de la masa, frecuencia o fluidez de las heces, típicamente con cantidades superiores a 200 g diarios. Es un síntoma habitual en muchas enfermedades intestinales tales como las infecciones, inflamación, isquemia, malabsorción y deficiencias nutricionales. Se puede presentar en forma aguda o crónica.

La diarrea aguda dura alrededor de 4 días, en general se asocia a agentes infecciosos y tiene una evolución autolimitada. En contraste, la diarrea se considera crónica cuando los síntomas persisten durante 4 semanas o más y se relaciona con SII, síndrome de malabsorción, trastornos endocrinos (hipertiroidismo y neuropatía diabética autonómica) o colitis por radiación.

Existen 4 causas primordiales para diagnosticar diarrea crónica:

- **Diarrea osmótica:** el agua es atraída hacia el interior del intestino por la naturaleza hiperosmolar de su contenido, sin embargo el colon es incapaz de reabsorber el exceso de líquido. Tiene lugar cuando no se absorben partículas con actividad osmótica. El líquido de la diarrea tiene una concentración al menos 50 mOsm superior al plasma.
- **Diarrea secretora:** se caracteriza por heces isotónicas y persiste durante el ayuno. Se intensifica en los procesos secretores del intestino y cuando un exceso de ácidos biliares permanece en el contenido intestinal, al tiempo que éste ingresa al colon. Dicha situación es frecuente en patologías del íleon, ya que las sales biliares se absorben en ese sitio. También puede presentarse con el crecimiento bacteriano excesivo en el intestino delgado, que interfiere con la absorción de la bilis y en el Síndrome de ZE, que sintetiza hormonas que inducen actividad secretora en el intestino. La diarrea por abuso de laxantes y VIPomas (tumor de células no beta de los islotes pancreáticos, que secreta VIP) se debe a la secreción activa de agua y electrolitos en el intestino, y puede incluirse en esta clasificación.
- **Diarrea por malabsorción:** producida por una absorción inadecuada de los nutrientes, se asocia a esteatorrea y cede con el ayuno.
- **Diarrea inflamatoria o exudativa:** se debe a una enfermedad inflamatoria (colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn) y se caracteriza por heces purulentas, sanguinolentas y persiste pese al ayuno.

### Análisis de las heces

Está indicado en el estudio de la diarrea crónica donde interesa diferenciar la diarrea de origen funcional de aquella orgánica, y con frecuencia es útil en pacientes con diarrea aguda de etiología infecciosa (gastroenteritis aguda). Además, en los últimos años ha demostrado su eficacia en el cribado de pacientes con cáncer colorrectal.

El estudio de heces comprende la valoración macroscópica (observación directa), el análisis químico y microscópico, el microbiológico y parasitológico de la deposición (más información consulta el material didáctico: cursos de Parasitología y Microbiología - FQByF).

- Toma de muestra

Se recomienda efectuar una higiene adecuada de la zona. El paciente debe orinar antes de realizar la deposición porque la orina tiene un efecto nocivo sobre los protozoos. La muestra de materia fecal se debe recolectar en un recipiente de plástico estéril (el que se utiliza para la recolección de orina descartable) y ser remitida al laboratorio lo antes posible. Las indicaciones al paciente deben ser claras para evitar la contaminación del exterior del recipiente, entre otras. La cantidad y el número de muestras pueden variar en función del estudio que se solicite. La muestra puede conservarse en la heladera con el recipiente cerrado y correctamente identificado.

✓ **Examen macroscópico**

Se debe registrar la cantidad, forma, consistencia y color de las heces. Las heces diarreicas son acuosas. La esteatorrea se caracteriza por heces blandas, malolientes y grises que flotan en el agua. El estreñimiento puede estar asociado con el paso de masas de heces pequeñas, firmes y esféricas. El color arcilla sugiere disminución o ausencia de bilis o presencia de sulfato de bario. La sangre que se origina en el intestino inferior, puede hacer que las heces se tornen rojas al igual que las remolachas en la dieta. Cuando el sangrado proviene del tracto GI superior es probable que las heces sean negras y de consistencia alquitranada. El bismuto, el hierro y el carbón también pueden causar un color negro. La presencia de moco reconocible en una muestra de heces es anormal y debe ser reportado. Mucosidad gelatinosa translúcida adherida a la superficie de las heces formadas sugiere estreñimiento espástico o colitis mucosa. Mucosidad sanguinolenta adherida a la masa fecal sugiere neoplasia o procesos inflamatorios del canal rectal. El moco asociado con pus y sangre pueden evidenciarse en heces de pacientes con colitis ulcerosa, disentería bacilar, diverticulitis ulcerosa y tuberculosis intestinal, entre otros.

También pueden encontrarse entre el material recolectado restos de parásitos, cuya presencia puede confirmarse con la evaluación de la muestra a nivel microscópico, en búsqueda de quistes o huevos.

✓ **Examen microscópico**

La técnica más simple es el examen microscópico que utiliza la tinción con Sudán III. Para ello, se toma una pequeña alícuota de suspensión de heces, se coloca en un portaobjetos y se mezcla con dos gotas de etanol al 95%; luego se añaden 2 gotas de

solución etanólica saturada de Sudán III y se aplica un cubreobjetos. En estas condiciones, los ácidos grasos se presentan como escamas ligeramente teñidas o como cristales en forma de aguja que no se tiñen. Las grasas aparecen como gotas grandes de color naranja o rojo. En cuanto a la presencia de fibras musculares, sólo se cuentan fibras rectangulares con estrías transversales, más de 10 fibras/campo sugiere mala digestión y/o hipermotilidad.

Para observar la celularidad en la muestra de materia fecal se realiza una tinción con lugol, colocando una pequeña gota de heces (intentando seleccionar la zona más representativa de la muestra total) y otra de lugol entre cubre y porta. Otra alternativa es llevar a cabo la observación utilizando como colorante el azul de metileno. Se deja reposar durante 2-3 minutos para una buena tinción nuclear. Mediante una visualización a 40x, se realizan recuentos cuantitativos promedio de leucocitos y eritrocitos, y en caso de encontrarlos, se informa además la presencia de quistes o huevos de parásitos, para lo cual se recomienda recorrer toda el área entre porta y cubreobjetos.

#### ✓ Examen microbiológico

El examen microbiológico de las heces tiene por objeto comprobar la presencia de algún microorganismo causante de enfermedad o de la existencia de una disbacteriosis o desequilibrio en la microbiota habitual del intestino (más información consulta el material didáctico del curso de Microbiología-FQByF).

### HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

La presencia de ciertos elementos en las heces puede orientar a un diagnóstico, como por ejemplo la aparición de leucocitos, en un proceso inflamatorio de la diarrea. La manipulación de la muestra y la experiencia del observador limitan a veces la fiabilidad de este examen.

- Lactoferrina fecal (LF): es una proteína de unión a hierro secretada por células del epitelio glandular y gránulos secundarios de los neutrófilos de la mucosa intestinal. Su liberación es proporcional al grado de inflamación de la mucosa y es liberada por los leucocitos fecales. Su determinación permite distinguir la diarrea inflamatoria (p. ej., colitis bacteriana o enfermedad inflamatoria del intestino) de la no inflamatoria (p. ej., colitis viral, SII). Su medición es precisa y presenta menos variación en el procesamiento de las muestras respecto al recuento de leucocitos antes descrito. LF se determina por inmunocromatográfica de un sólo paso para la detección semi-cuantitativa de lactoferrina humana (hLf).

- Calprotectina fecal (CF): es una proteína citosólica fijadora de calcio y zinc presente en los neutrófilos y monocitos. Los niveles de CF incrementan cuando existe inflamación intestinal, como por ejemplo, identificar a pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, además es útil en el monitoreo de la actividad inflamatoria, en la predicción de recurrencia postoperatoria, o en la predicción de recidiva. Se determina por técnicas de enzoinmunoanálisis (ELISA) y de inmunocromatografía de flujo lateral (LFIA) o “test rápidos”. VR de CF < 50 µg/g.

### **- Análisis de sangre oculta en heces**

La prueba de sangre oculta en materia fecal (SOMF) depende de la actividad de la peroxidasa de hemoglobina (Hb). La persona normal pierde de 0,5 a 1,5 mL de sangre en el tracto GI diariamente en asociación con el desprendimiento normal de células epiteliales. Las pruebas comerciales están diseñadas para ser positivas con una pérdida de sangre superior a 5-10 mL/día. Esto corresponde a 5–10 mg de Hb/g de heces, asumiendo una Hb en sangre de 15 g/dL y un promedio diario de heces de 150 g.

Además del manejo y análisis de muestras, la dieta es muy importante en estas pruebas. La alta tasa de falsos positivos se debe a la falta de especificidad de los reactivos y a la presencia de actividad peroxidasa en otros constituyentes fecales, así como a la sensibilidad de los diferentes cromógenos a la actividad de la peroxidasa. La mioglobina y la Hb de la carne y el pescado ingeridos tienen actividad de peroxidasa que puede indicar falsamente la presencia de sangre oculta. Las bacterias en el intestino, así como las verduras y frutas (rábano, nabos, plátanos, uvas negras, peras y ciruelas) tienen peroxidasa y pueden elevar la actividad de la peroxidasa fecal. Los falsos negativos ocurren en presencia de altas dosis de vitamina C y otros antioxidantes.

La preparación del paciente y la recolección de muestras son importantes para garantizar resultados válidos. Durante las 72 h previas, los pacientes deben seguir una dieta libre de actividad de peróxido exógeno (carne, pescado, nabos, rábano), irritantes gastrointestinales (aspirina, antiinflamatorios no esteroideos) y vitamina C.

Las *pruebas inmunoquímicas* para la Hb humana son más sensibles y específicas y producen menos falsos negativos. Son útiles para la detección de sangre del tracto intestinal inferior y son insensibles al sangrado GI superior porque la globina se destruye en el intestino delgado. Las peroxidases dietéticas no afectan sus resultados. La evidencia ha demostrado la utilidad clínica de estas pruebas para detectar el cáncer de colon en una etapa más temprana, lo que podría resultar en la disminución de la mortalidad. Debido a la biología clínica generalmente favorable de estos tumores cuando se detectan en forma precoz, el costo bajo (se adquiere comercialmente) y la naturaleza no invasiva de dicha prueba, se emplea como una técnica de elección.

En general, la prueba es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral en sándwich. El cassette contiene: 1) una membrana cubierta con anticuerpo de Hb anti-humana en la región de línea de prueba (T) y anticuerpo de cabra anti-ratón en la región de control (C) y, 2) una almohadilla con conjugado oro anticuerpo coloidal Hb anti-humana, que se coloca al final de la membrana. Cuando la Hb está presente en la muestra fecal (disuelta en un medio salino), la mezcla de conjugado oro coloidal y la muestra se mueven a través de la membrana por capilaridad. Esta mezcla luego migra a la región T y forma una línea visible mientras los anticuerpos se mezclan con la Hb. Si hay presencia de Hb en la muestra con una cantidad de 25 ng/mL o mayor, ésta se une a los conjugados anti Hb humana formando una banda T de color borgoña, indicando un valor positivo de la prueba. La ausencia de la banda T sugiere un resultado negativo. El control interno debe exhibir una banda de color borgoña correspondiente el inmunocomplejo del conjugado de cabra anti-IgG de ratón (IgG de ratón oro, independiente de la presencia de la banda T, de lo contrario el resultado de la prueba no es válido.



La sangre oculta puede originarse en cualquier parte del intestino y es el primer signo de advertencia de malignidad GI. Otras fuentes potenciales de sangre oculta pueden surgir de sangrado de várices esofágicas, pólipos, inflamación esofágica o gástrica, hemorroides o fisuras, enfermedad inflamatoria intestinal, úlcera péptica o angiodisplasias de colón.

Una prueba de SOMF positiva requiere una evaluación adicional para diagnosticar una lesión GI que incluyen sigmoidoscopia con enema de bario o colonoscopia completa, siendo esta última la modalidad preferida. Un test negativo, sin embargo, no puede descartar definitivamente la presencia de neoplasia o daño colónico.

La prueba de ADN fecal es una técnica prometedora para el cáncer colorrectal ya que tiene alta especificidad y sensibilidad. Consiste en la recolección de una sola muestra de heces, que luego se analiza en busca de marcadores de ADN. La PCR se usa para amplificar el ADN en heces y es útil porque el ADN se desprende continuamente y permanece estable en las heces y se detectan cantidades diminutas.

### **Elastasa Fecal**

La elastasa-1 es una enzima similar a la quimiotripsina secretada por el páncreas. La medición de dicha enzima en heces se ha propuesto como una prueba sensible de la función pancreática. Se ha demostrado que útil en el diagnóstico de fibrosis quística en niños. El intervalo de referencia para elastasa fecal es mayor de 200 ug/g, en caso de insuficiencia pancreática moderada se encuentra en tre 100 y 200 ug/g y en insuficiencia pancreática grave es menor de 100 ug/g.

### **Esteatocrito ácido**

Consiste en la medición del contenido de grasa fecal total en una muestra aleatoria de heces por un método gravimétrico. La grasa se extrae por acidificación y se separa del resto de la materia sólida fecal por centrifugación. El esteatocrito expresa el porcentaje que ocupa la capa grasa sobre el total de materia sólida fecal. Es un método estandarizado para cuantificar la grasa fecal, simple y rápido, ya que no requiere una dieta especial y basta con una única muestra de heces. Esta técnica presenta una sensibilidad del 100%, una especificidad del 95% y un valor predictivo positivo del 90% respecto con la prueba de Van de Kamer, considerada el estándar de oro.

## **ALTERACIONES DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL**

La malabsorción se caracteriza por una absorción defectuosa de las grasas, vitaminas hidro- y liposolubles, proteínas, hidratos de carbono, electrolitos, minerales y agua, que tiene lugar desde la luz del intestino hasta el compartimento del líquido extracelular. Puede afectar de manera selectiva un solo componente, como la vitamina B12 o la lactosa, o a todas las sustancias que se absorben en un segmento específico del intestino. Los trastornos por malabsorción crónicos que más se observan en los países occidentales son la insuficiencia pancreática, enfermedad celíaca y enfermedad de Crohn. La malabsorción se debe a alteraciones en una de las cuatro fases de la absorción de nutrientes:

- Digestión intraluminal, durante la cual las proteínas, los hidratos de carbono y las grasas se degradan hasta la forma absorbible.
- Digestión terminal, consiste en la hidrólisis de los hidratos de carbono y los péptidos por las disacaridasas y peptidasas, respectivamente, en el borde en cepillo de la mucosa del intestino delgado.
- Transporte transepitelial, permite el transporte de nutrientes, líquidos y electrolitos a través del epitelio del intestino delgado con el consiguiente procesamiento de los mismos.
- Transporte linfático de los lípidos absorbidos.

- Síndrome de malabsorción

Las personas con malabsorción intestinal generalmente tienen síntomas que son propios del tubo GI, como diarrea crónica, flatulencia, distensión, dolor o cólicos abdominales y ascitis. Las manifestaciones clínicas se relacionan con debilidad, desgaste muscular, pérdida de peso y distensión abdominal. Uno de sus rasgos es la esteatorrea, que se caracteriza por heces con exceso de grasas, voluminosas, espumosas, de color amarillento-grisáceo y con mal olor. Junto con la pérdida de grasa en las heces, también hay una incapacidad para absorber vitaminas liposolubles. Esto puede ocasionar sangrado y equimosis (por deficiencia de vitamina K), dolor óseo y predisposición al desarrollo de fracturas y tetania (deficiencia de vitamina D y calcio), anemia macrocítica y glositis (deficiencia de ácido fólico) o neuropatía por deficiencia de vitamina A o B12. Asimismo, pueden aparecer diversos trastornos endocrinos o cutáneos. La tabla 3 describe los signos y los síntomas de las anomalías en la constitución de los componentes de la dieta.

Tabla 3. Sitios y elementos necesarios para la absorción de los constituyentes de la dieta y manifestaciones de malabsorción.

CONSTITUYENTE	SITIO DE ABSORCIÓN	ELEMENTOS NECESARIOS	MANIFESTACIONES
<b>Agua y electrolitos</b>	Principalmente intestino delgado	Gradiente osmótico	Diarrea
<b>Grasas</b>	Yeyuno superior	Lipasa pancreática Sales biliares Conductos linfáticos funcionales	Deshidratación Cólicos Pérdida de peso Esteatorrea Deficiencia de vitaminas liposolubles
<b>Hidratos de carbono</b>			
Almidones	Intestino delgado	Amilasa Maltasa Isomaltasa, α-dextrinas	Diarrea Flatulencias Molestias abdominales
Sacarosa	Intestino delgado	Sacarasa	
Lactosa	Intestino delgado	Lactasa	
Maltosa	Intestino delgado	Maltasa	
Fructosa	Intestino delgado		
Proteínas	Intestino delgado	Enzimas pancreáticas (p. ej., tripsina, quimiotripsina, elastina)	Pérdida de masa muscular Debilidad Edema
<b>Vitaminas</b>			
A	Yeyuno superior	Sales biliares	Ceguera nocturna Xeroftalmía Iritación de la córnea Quelosis
Ácido fólico	Duodeno y yeyuno	Absorción; puede verse alterada por algunos fármacos (p. ej., anticonvulsivos)	Glositis Anemia megaloblástica Glositis Neuropatía Anemia megaloblástica
B <sub>12</sub>	Íleon	Factor intrínseco	Ostealgia Fracturas Tetania Inciertas
D	Yeyuno superior	Sales biliares	Fácil formación de equimosis y sangrado Ostealgia
E	Yeyuno superior	Sales biliares	
K	Yeyuno superior	Sales biliares	
<b>Calcio</b>	Duodeno	Vitamina D y hormona paratiroidea (paratohormona)	Fracturas Tetania Anemia por deficiencia de hierro Glositis
<b>Hierro</b>	Duodeno y yeyuno	pH normal (secreción de ácido clorhídrico)	

La presentación temprana de malabsorción es sutil. En la situación que el médico sospeche malabsorción por razones clínicas se basará en el laboratorio para ayudar en el diagnóstico. Se solicitará al paciente un examen con pruebas de rutina como hemograma, concentraciones séricas de folato, ferritina, calcio, albúmina, fosfatasa alcalina, entre otras y pruebas de anticuerpo para enfermedad celíaca.

Las pruebas de detección para esteatorrea incluyen examen microscópico de heces para glóbulos de grasa y determinación de carotenoides séricos. Los carotenoides son un grupo de compuestos precursores de Vit A y su absorción en los intestinos depende de la presencia de grasas en la dieta. Los carotenoides no se almacenan en el cuerpo, y su falta en la dieta o alteraciones en la absorción de lípidos del intestino puede resultar en una disminución de sus niveles séricos.

### **Enfermedad celíaca**

La enfermedad celiaca (EC), también denominada esprúe celíaco o enteropatía sensible al gluten, es un trastorno autoinmune que se origina por intolerancia a las gliadinas del trigo y prolaminas contenidas en otros cereales que ocasionan daño a la mucosa del intestino delgado en grado variable (inflamación crónica y atrofia de la mucosa), en individuos genéticamente susceptibles. Hasta hace poco tiempo se la consideraba un síndrome por malabsorción, hoy se conoce por ser una de las enfermedades genéticas más frecuentes en la población general. Se presenta con heterogeneidad clínica en todos los grupos etarios. El tratamiento principal de la EC consiste en una dieta exenta de gluten, que consigue mejorar los síntomas en la mayor parte de los pacientes.

### **Patogénesis**

La EC es el resultado de la interacción entre el gluten y factores inmunológicos, genéticos y ambientales. Los cereales contienen prolaminas como gliadina (del trigo), hordeína (de la cebada) y secalina (del centeno). La avenina (de la avena) es genéticamente distante a los granos mencionados y raramente desencadena EC.

La gliadina es pobremente digerida en el tracto GI, resistiendo la acidez gástrica, enzimas pancreáticas y las proteasas del ribete en cepillo intestinal. Los péptidos de gliadina pueden atravesar el epitelio por vía transcelular, paracelular y ligados a inmunoglobulina (Ig) A secretora, siendo el péptido más inmunogénico el alfa-2-gliadina 33-mer. En la lámina propia los péptidos de gliadina son deaminados por la transglutaminasa tisular-2, y así pueden interactuar con las células presentadoras de antígeno. La respuesta innata se caracteriza por sobre-expresión de interleuquina 15 y la activación de linfocitos intra-epiteliales del tipo *natural killer* que ejercen su acción citotóxica sobre los enterocitos. La respuesta adaptativa es liderada por linfocitos T CD4+ que se activan al interactuar con la

gliadina presentada por las células presentadoras de antígenos con complejo mayor de histocompatibilidad HLA-DQ2 o HLA-DQ8, expresándose citoquinas pro-inflamatorias como interferón- $\gamma$  y así generando una cascada inflamatoria con liberación de metaloproteinasas 1, 3 y 9 que inducen el daño tisular (Fig. 16).

La autoinmunidad se corrobora al demostrar una respuesta celular mediada por linfocitos CD4+ y la presencia de autoanticuerpos en contra de la transglutaminasa tisular (anti-tTg y tTg2), que son proteínas pertenecientes a una familia de enzimas citoplásmicas dependientes de calcio. La expresión de la enzima se incrementa en EC, entrecruza o desamida selectivamente residuos de glutamina de las proteínas mejorando su unión a HLA DQ2/DQ8 y aumenta el reconocimiento de estos péptidos por las células T derivadas del intestino de sujetos con EC.

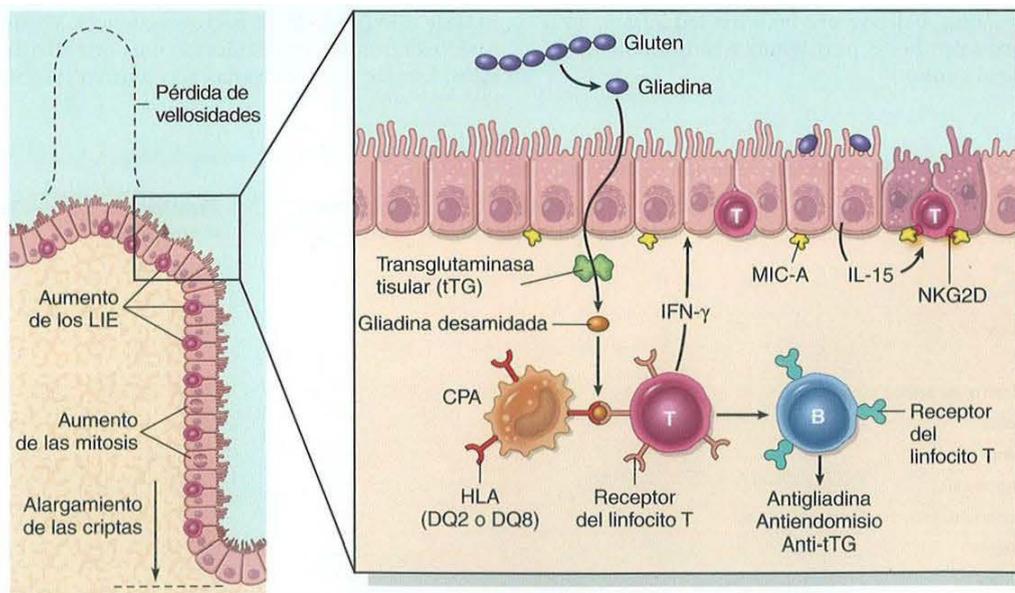


Figura 16. Alteraciones morfológicas que pueden aparecer en la enfermedad celíaca: atrofia de las vellosidades intestinales, aumento del número de linfocitos intraepiteliales (LIE) y proliferación epitelial con alargamiento de las criptas (izquierda). Modelo de la patología de la enfermedad celíaca (derecha): se observa que tanto los mecanismos inmunitarios innatos como los adaptativos participan en las respuestas tisulares frente a la gliadina. Se muestran linfocitos T CD4+ (producen IFN- $\gamma$ ) en la lámina propia y linfocitos T CD8+ que expresan el receptor de NKG2D entre las células epiteliales. CPA, célula presentadora de antígeno. Porth Fisiopatología. Alteraciones de la salud. Conceptos básicos. 10ª Ed (2019).

La mayoría de los pacientes con EC expresan HLA-DQ2 (95%) y el HLA-DQ8 (5%). Si bien la presencia de estos alelos es indispensable para el diagnóstico de EC, se requiere la interacción con otros factores medioambientales para su desarrollo. Se han identificado otros genes no HLA: COELIAC2 (que contiene clusters de genes de citoquinas), COELIAC3 (que codifica la molécula CTLA4, *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), COELIAC4 (que

codifica variantes del gen de la miosina y de los genes de interleukinas 2 y 21) y otros genes relacionados a la respuesta inmune.

Las manifestaciones clínicas de la EC tienen un espectro amplio que va desde el síndrome de malabsorción hasta la enfermedad asintomática. La EC se clasifica desde un punto de vista clínico en: 1- Sintomática (síntomas gastrointestinales o extra-intestinales evidentes); 2- Asintomática (se diagnostica con serología y biopsia en pacientes sin síntomas; y 3- Potencial (pacientes con serología positiva y biopsia de intestino delgado normal). (Tabla 4). La EC en la infancia se puede presentar con retraso en el crecimiento, diarrea, desgaste muscular, distensión abdominal y en ocasiones, desnutrición grave. En los niños mayores se observa anemia, complexión pequeña, defectos en el esmalte dental y estreñimiento.

Tabla 4. Manifestaciones clínicas de la enfermedad celíaca sintomática

Manifestaciones gastrointestinales	Manifestaciones extraintestinales
Diarrea	Alopecia
Dolor abdominal	Alteración de las pruebas de funcionamiento hepático
Pérdida de peso	Amenorrea
Estreñimiento	Anemia
Anorexia	Ansiedad
Dispepsia	Artralgias
Distensión	Artritis
Flatulencia	Ataxia
Náuseas	Cefalea
Vómitos	Depresión
	Estatura corta
	Estomatitis aftosa recurrente
	Fatiga crónica
	Hipoplasia dental y pérdida del esmalte
	Dermatitis herpetiforme
	Infertilidad
	Irritabilidad
	Mialgias
	Osteoporosis

No existe una relación consistente entre la clínica y el grado de atrofia vellositaria, incluso la mayoría de los pacientes con cuadro silente pueden presentar atrofia vellositaria total. La extensión del compromiso intestinal no se asocia con la severidad de la presentación clínica.

Diversas patologías autoinmunes se asocian a EC, que incluyen a la diabetes mellitus tipo 1, tiroiditis autoinmune, otras endocrinopatías, dermatitis herpetiforme, familiares en primero y segundo grados con EC y pacientes con síndrome de Turner, entre otras.

A su vez, cabe mencionarr que la alergia a los componentes del trigo se manifiesta como una reacción inmune asociada a IgE, que desencadena una respuesta inflamatoria contra alfa-amilasa/inhibidor de la tripsina, proteína de transferencia de lípidos no específicos, gliadinas y gluteninas de alto peso molecular, y epidemiológicamente más frecuente en la población pediátrica.

La EC refractaria es rara, afecta a menos del 2% de los enfermos celíacos y es más frecuente en hombres con diagnóstico establecido en la edad adulta. La hipoalbuminemia es un factor de mal pronóstico y los autoanticuerpos tTg y antiendomiso (EMA) son negativos. Es un diagnóstico que requiere la exclusión sistemática de otras causas más comunes de falta de respuesta a la dieta libre de gluten. Existen 2 tipos de EC refractaria de acuerdo a su inmunofenotipo: tipo I, mediada inmunológicamente y responde bien al tratamiento médico, y el tipo II, caracterizada por clones de linfocitos intraepiteliales monoclonales y tiene pobre pronóstico debido a su asociación con desnutrición grave y linfoma intestinal.

## Laboratorio

### Test serológicos

El diagnóstico de la EC se basa en sus manifestaciones clínicas con apoyo de las pruebas serológicas y se confirma mediante biopsia de la mucosa intestinal. Una serología positiva se refiere a la detección de anticuerpos contra péptidos desaminados de gliadinas (PDG) o anti-transglutaminasa tisular (AtTg) y/o EMA, mientras que las alteraciones histológicas pueden ser acortamiento de las vellosidades y aumento de linfocitos intraepiteliales. La falta de estandarización de ensayos para anticuerpos IgA-antigliadina (AGA) contribuye a una precisión diagnóstica variable y posee baja sensibilidad y especificidad, por ello no es utilizado en diagnóstico de EC.

El AtTg basado en IgA (AtTg-IgA) es el test diagnóstico y de seguimiento de primera elección con una alta sensibilidad (98%) y especificidad (95%), considerando el test por ELISA con tTG recombinante humana. Los anticuerpos EMA-IgA se determinan por inmunofluorescencia indirecta utilizando secciones de esófago de mono o cordón umbilical humano. Debido al déficit de inmunoglobulina A, descrito en el 2-3% de los pacientes con EC, se recomienda determinar con AtTg-IgG o IgG anti-péptido gliadina deaminado (DGP) en estos individuos. Cabe recordar que no existe una buena correlación entre los niveles serológicos de los anticuerpos con la clínica y el grado de atrofia. Pueden existir falsos positivos en hepatopatías (cirrosis biliar primaria, cirrosis hepática y hepatitis crónicas por el virus de la hepatitis C [VHC]), artritis reumatoide, psoriasis o enfermedad de Crohn, por lo que en estas patologías es aconsejable validar el resultado con EMA.

Los anticuerpos DPG mejoran la eficiencia de los anticuerpos antigliadina clásicos, alcanzando sensibilidad similar a los AtTg-IgA y especificidad similar a los EMA-IgA, con la peculiaridad de que no necesitan cribado del déficit de IgA. La expresión del heterodímero HLA-DQ2 y del HLA-DQ8 no permite el diagnóstico de celiaquía, aunque ayuda a identificar a individuos susceptibles de padecer la enfermedad en grupos de riesgo.

Otras determinaciones bioquímicas:

- El exámen hematológico (hemograma) permite diagnosticar una anemia microcítica ferropénica (la más común en la EC) o macrocítica por déficit de folatos; la anemia secundaria a déficit de vitamina B12 es más rara debido a que el íleon terminal, donde se absorbe la B12, es el tramo menos afectado. Si se combinan ferropenia y déficit de folato, la anemia puede ser normocítica. En algunos casos se pueden observar leucopenia y trombocitopenia.

- Química clínica: se puede objetivar hipocolesterolemia, hipocalcemia y niveles bajos de fósforo, zinc y magnesio. En el proteinograma, en los casos sintomáticos, se detecta hipoalbuminemia, que puede producir edemas. En algunos casos aparece aumento de transaminasas como único hallazgo patológico.

- Puede existir malabsorción de grasas y, en consecuencia, los niveles de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) se encuentran disminuidos. El déficit de vitamina K produce un estado de hipocoagulabilidad con alargamiento del tiempo de protrombina. La grasa en heces se puede detectar con el estudio de la digestión simple de heces (test cualitativo) mediante la tinción de Sudán y la cuantificación de la grasa en heces de 72 h (test de Van de Kamer), prueba sensible para evaluar la digestión y absorción de las grasas.

Se pueden realizar otras pruebas de malabsorción de hidratos de carbono (d-xilosa, test de tolerancia a la lactosa, prueba de aliento de hidrógeno con lactosa, etc.), de proteínas (test de Gordon), de sales biliares (prueba de SeHCAT), de vitamina B12 (test de Schilling) y pruebas de sobrecrecimiento bacteriano (test de aliento, cultivo de aspirado duodenal).

### **Intolerancia a los hidratos de carbono**

#### Deficiencia de disacaridasa

La presencia de las disacaridasas en borde en cepillo es esencial para la absorción de los hidratos de carbono, y una reducción en su actividad conduce a malabsorción de los mismos e intolerancia. La hipolactasia de tipo adulto es la más común.

#### - Deficiencia congénita de lactasa

Es un trastorno autosómico recesivo debido a mutaciones del gen que codifica la lactasa por lo tanto la actividad de la enzima en la mucosa es baja o indetectable al nacer. Esta enfermedad es rara y cursa con diarrea explosiva, heces espumosas y acuosas, y distensión abdominal tras la ingesta de leche. Los azúcares no absorbidos, retenidos en la luz intestinal, ejercen un efecto osmótico causante de diarrea (con aumento de la secreción de agua y electrolitos a la luz). Al llegar al colon, las bacterias fermentan los hidratos de carbono, lo que disminuye el pH de las heces, y las cuales contienen aumento de lactosa y

glucosa producidas por acción bacteriana sobre la lactosa no digerida (Fig. 17). Un diagnóstico definitivo debe diferirse hasta después que la maduración de la síntesis de lactasa se haya producido en el sistema. Mientras tanto, el alivio depende de ajustes en la composición de la dieta. Una prueba de tolerancia oral a la lactosa anormal obtenida unos meses después del nacimiento también podría ser causada por intolerancia congénita a la glucosa-galactosa. Se debe realizar el diagnóstico diferencial mediante una prueba oral de tolerancia a la glucosa y la prueba de tolerancia a la lactosa.

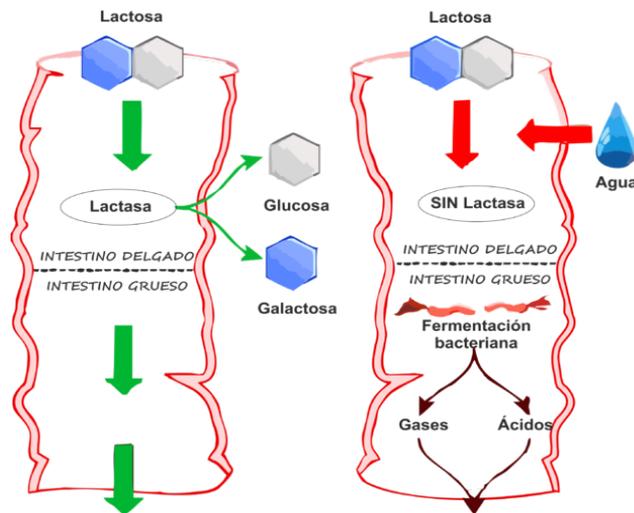


Figura 17. Efecto de la ausencia de la enzima lactasa a nivel intestinal. <https://biolanhealth.com/es/2021>

- Hipolactasia de tipo adulto ("deficiencia adquirida de lactasa")

En la mayoría de los humanos (y demás mamíferos), la expresión de la enzima lactasa en la edad adulta es un 10% o menos respecto a los observados en la infancia. La deficiencia adquirida de lactasa se debe a una regulación a la baja de la expresión del gen de la enzima. Se sospecha de intolerancia a la lactosa si se presentan síntomas como flatulencia, malestar abdominal, hinchazón o diarrea luego del consumo de uno o dos vasos de leche, helado o yogur. También puede ocurrir por una reducción de la actividad enzimática luego del daño intestinal difuso por infección (giardiasis, sobrecrecimiento bacteriano o gastroenteritis viral), colitis ulcerosa y EC.

Pruebas de diagnóstico para la deficiencia de lactasa

1- Prueba de tolerancia oral a la lactosa:

Se mide el aumento de la glucosa plasmática o galactosa después de la ingestión de lactosa (50 g/200 mL de agua) y en niños (2 g/kg, hasta un máximo de 50 g). Se recogen muestras de sangre a los 0 (basal), 60 y 120 min post ingesta. Para excluir la deficiencia de lactasa, el aumento por encima de la línea de base para la glucosa plasmática debe ser

superior a 20 mg/dL. Pueden aparecer falsos positivos en pacientes con diabetes o sobrecrecimiento bacteriano.

## 2- Prueba de hidrógeno en el aliento:

Es una técnica utilizada para valorar la intolerancia a la lactosa. El hidrógeno del aliento se deriva del metabolismo bacteriano en el tracto intestinal. En la deficiencia de lactasa, el disacárido (lactosa) pasa al intestino grueso, ya que no se metaboliza ni absorbe, y el metabolismo bacteriano produce hidrógeno, el cual se absorbe a circulación sistémica y es exhalado en la respiración. El hidrógeno puede medirse en el aliento final de la espiración con el uso de monitores de hidrógeno electroquímicos.

La preparación adecuada del paciente es esencial para asegurar niveles basales estables de hidrógeno en el aliento. Se deben evitar alimentos a base de trigo y fibra durante 12 h previas a la realización de la prueba y realizar un enjuague bucal sin alcohol, ya que éste puede interferir con la medida de hidrógeno. Después de un ayuno nocturno, se registra el nivel basal de hidrógeno en el aliento, se administra la lactosa (50 g) y luego se mide el H<sub>2</sub> a los 15, 30, 60, 90 y 120 min. Un aumento de hidrógeno en el aliento superior a 20 ppm (20 µL/L) a los 60 a 120 min respecto al valor en ayunas, es indicativo de malabsorción de lactosa. Ante una absorción normal de lactosa, los niveles de hidrógeno en el aliento permanecerán de 2 a 5 ppm durante toda la prueba. Pueden observarse falsos positivos si no se cumple el ayuno, en casos de sobrecrecimiento bacteriano o si el paciente ha fumado el mismo día de la prueba. Pueden presentarse falsos negativos si el paciente ha tomado antibióticos recientemente o en caso de insuficiencia respiratoria.

Un resultado positivo de hidrógeno en el aliento después de la ingestión de la lactosa también puede ocurrir en la malabsorción de glucosa-galactosa. Ésta puede ser confirmada o excluida por una prueba de aliento en la que se sustituyen los 50 g de lactosa por 25 g de glucosa y galactosa. Un aumento de hidrógeno en el aliento confirma el diagnóstico.

## Prueba de absorción de D-xilosa

D-xilosa es una pentosa que, en condiciones normales, no se halla presente en la sangre. Al igual que otros monosacáridos, las pentosas se absorben sin cambios en la región proximal del intestino delgado y no requieren la intervención de las enzimas líticas pancreáticas. Por tanto, la capacidad para absorber D-xilosa es valiosa para realizar el diagnóstico diferencial entre malabsorción intestinal de aquella por insuficiencia pancreática. Debido a que sólo la mitad de la D-xilosa administrada por vía oral se metaboliza o pierde por acción de las bacterias intestinales, se excretan cantidades significativas por la orina. Algunos protocolos han usado la medición sólo de D-xilosa excretada por la orina durante las 5 h siguientes a la ingesta de una dosis de 25 g para adulto en ayunas (0,5 g/kg en

niños). No obstante, con función renal normal, es común obtener resultados falsos positivos y falsos negativos. Las concentraciones sanguíneas medidas una o más veces después de la ingesta de D-xilosa (p. ej., a 30 min, 1 h, 2 h) mejoran la veracidad diagnóstica de la prueba. Se suelen utilizar dosis menores de D-xilosa para evitar cólico abdominal, hipermotilidad intestinal y diarrea osmótica. Los niveles bajos de xilosa en sangre y orina nos indican una mala absorción.

### **Sobrecrecimiento bacteriano (SIBO)**

El sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (SIBO, por sus siglas en inglés) refiere a un cuadro de malabsorción originado por cambios en la microbiota intestinal secundarios a hipoclorhidria gástrica, motilidad intestinal (presente en enfermedades como esclerodermia, amiloidosis, neuropatía diabética, etc.), o a alteraciones estructurales intestinal (divertículos intestinales, asas ciegas quirúrgicas tras gastrectomía, estenosis, etc).

En condiciones normales, el segmento proximal del intestino delgado contiene menos de  $10^5$  bacterias/mL, principalmente bacterias aerobias grampositivas. Esta bajo recuento bacteriano se mantiene gracias al peristaltismo, la secreción normal de ácido gástrico, el moco, la IgA secretora y una válvula ileocecal intacta.

En el SIBO Las especies más comunes incluyen estreptococos, *Bacteroides*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Klebsiella* y *Aeromonas*. Las bacterias desconjugan sales biliares provocando un fallo en la formación de micelas con la consiguiente malabsorción de grasas. Además, el exceso de bacterias consume nutrientes, incluidos hidratos de carbono y vitamina B12, y en consecuencia privación calórica y deficiencia de la vitamina. El uso de los IBP se asocia con un mayor riesgo de infecciones bacterianas y colonización.

Los síntomas del sobrecrecimiento bacteriano incluyen dolor, distensión abdominal, flatulencia, diarrea y esteatorrea. El método de referencia para el diagnóstico de SIBO es el cultivo cuantitativo del aspirado de líquido intestinal (endoscopía) que muestra un recuento bacteriano  $> 10^3$  unidades formadoras de colonias/mL. En la práctica, en pacientes sintomáticos se sugiere la realización de una prueba del aliento, en forma específica con glucosa e hidrógeno o lactulosa e hidrógeno. Ambos sustratos se metabolizan cuando se exponen a las bacterias intestinales, con la producción del H<sub>2</sub> y el metano (CH<sub>4</sub>). Estos gases son absorbidos desde el tracto gastrointestinal hacia la sangre y, finalmente, exhalados a través de los pulmones. Se considera diagnóstico un aumento en las concentraciones de H<sub>2</sub>, con respecto al basal  $> 20$  ppm en 90 minutos y de CH<sub>4</sub> de  $> 10$  ppm dentro de las 2 h.

### Malabsorción de ácidos biliares (AB)

Los AB se sintetizan en el hígado y pasan a la luz del intestino delgado a través de la vesícula biliar. Están presentes en la bilis como conjugados de taurina o glicina. Su función principal es actuar como agentes tensioactivos, formando micelas y facilitando la digestión de los triglicéridos y la absorción de colesterol y vitaminas liposolubles. En el íleon terminal se reabsorbe más del 90% de AB, y de allí regresa al hígado por la circulación portal y se secreta nuevamente en la bilis (circulación enterohepática). Menos del 10% del AB secretado se pierde en las heces.

La malabsorción de AB provoca diarrea crónica en casos de enfermedad ileal (enfermedad de Crohn), o después de la resección del íleon terminal; colecistectomía y en pacientes con SII. La diarrea se puede producir por depleción severa de sales biliares (deficiencia intraluminal) que lleva a malabsorción de grasas y esteatorrea. La malabsorción de sales biliares es una condición infradiagnosticada y debe sospecharse en pacientes con diarreas crónicas inexplicables (Fig. 18).

Las causas de la diarrea por los AB incluyen: una deficiencia en el factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF-19) (hormona producida en los enterocitos, que regula la síntesis de los AB hepáticos); variaciones genéticas que afectan las proteínas involucradas en la síntesis y circulación enterohepática de los AB o en el receptor TGR5, que media las acciones de los AB (secreción y motilidad) en el colon.

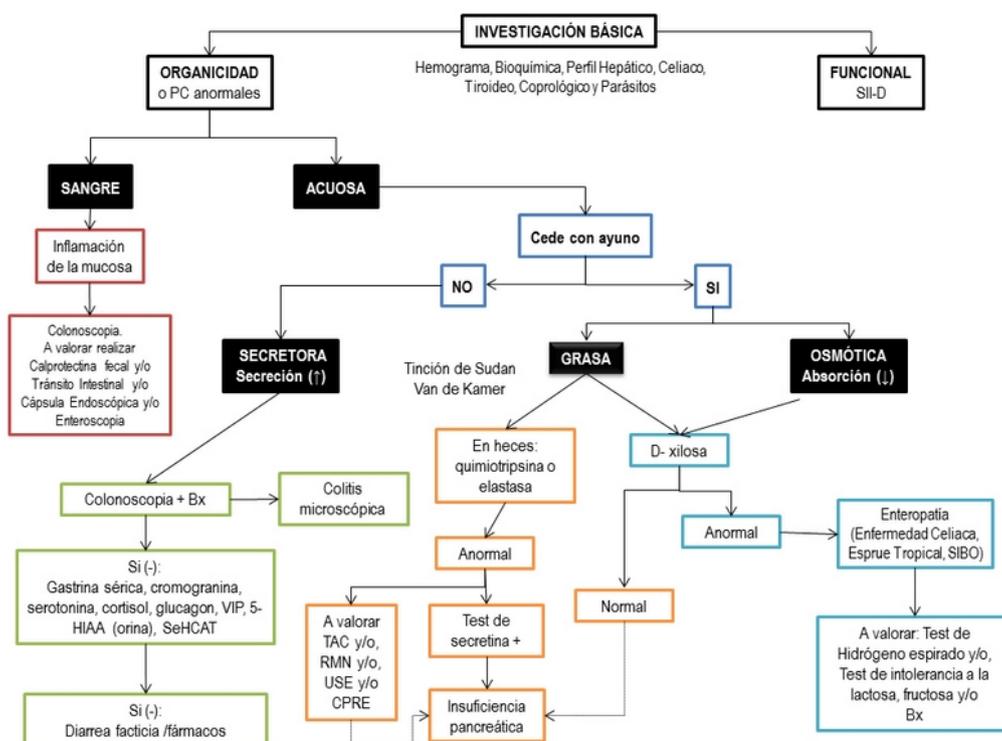


Figura 18. Algoritmo abordaje diagnóstico de la diarrea crónica. <https://actagastro.org/abordaje-diagnostico-de-la-diarrea-cronica/>

Hay varios métodos para diagnosticar la malabsorción de AB:

- Retención del ácido homotaurocólico marcado con selenio ( $^{75}\text{SeHCAAT}$ , prueba de medicina nuclear): implica la administración oral de este metabolito sintético radioactivo, el cual es identificado por cámara gamma (gamagrafía) en cuerpo entero para estimar el nivel basal luego de 1 h, siendo la próxima medición a los 7 días. Se retiene normalmente más del 15 % de la dosis administrada. Si la retención es menor al 10 % se considera diagnóstico.
- Medición de  $7\alpha$ -hidroxi-4-colesterol-3-ona sérico en ayunas: este metabolito es el intermediario entre el colesterol y el ácido taurocólico, refleja la actividad de la enzima hepática colesterol  $7\alpha$ -hidroxilasa, y por lo tanto la tasa de síntesis de AB. La malabsorción de AB se asocia con un aumento sérico de  $7\alpha$ -hidroxi-4-colesten-3-ona a medida que aumenta la síntesis hepática para mantener el nivel de AB circulantes.
- Medición de FGF19 en suero en ayunas (pg/ml, ELISA): sus niveles reflejan la recaptación de los AB lumbinales por el transportador del AB ileal. Un nivel en ayunas  $< 145$  pg/mL tiene un valor predictivo positivo (61 %) y negativo (82 %) para la malabsorción de AB.
- Medición de los AB fecales en la recolección de 48 h: se realiza durante los dos últimos días de una dieta alta en grasas y es el estándar de oro para medir la excreción de los AB con un valor  $> 2,337$   $\mu\text{mol}/48$  h usado como índice de la MAB. Los AB fecales pueden cuantificarse mediante una cromatografía por cualquiera de los siguientes métodos: cromatografía de gases o líquida de alta resolución o espectrometría de masas.

## ENFERMEDAD INTESTINAL INFLAMATORIA

El término de enfermedad intestinal inflamatoria (EII) se emplea para designar a dos alteraciones relacionadas: la **enfermedad de Crohn** y la **colitis ulcerosa**. (Fig. 19).

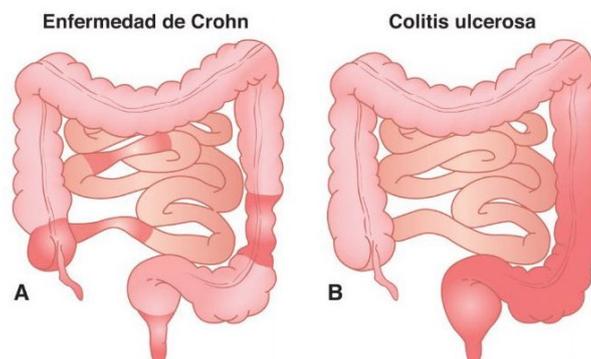


Figura 19. Patrones de distribución de la enfermedad con (A) lesiones salteadas en la enfermedad de Crohn y (B) afectación continua del colon, que se desarrolla en el recto, en la colitis ulcerosa. Porth Fisiopatología. Alteraciones de la salud. Conceptos básicos. 10ª Ed (2019).

Se ha observado una superposición en la presentación clínica, radiológica y hallazgos histológicos entre la enfermedad de Crohn (que puede afectar cualquier parte del tracto GI) y la colitis ulcerosa (que está confinada al intestino grueso). Ambas condiciones se presentan con diarrea, dolor o malestar abdominal, a menudo asociado con fatiga y anemia, y en menor grado con inflamación de las articulaciones, la piel y los ojos (Tabla 5).

La patogénesis de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa implica un fallo en la regulación inmunitaria, la predisposición genética y un desencadenante ambiental, en particular la flora microbiana. Se produce en la mucosa y submucosa como consecuencia de la activación de los mecanismos de respuesta inmunitaria innata. El daño tisular es consecuencia de la activación de neutrófilos y la producción de mediadores proinflamatorios.

Tabla 5. Características distintivas de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa

CARACTERÍSTICA	ENFERMEDAD DE CROHN	COLITIS ULCEROSA
Tipo de inflamación	Granulomatosa	Ulcerativa y exudativa
Nivel de compromiso	Principalmente submucoso	Principalmente mucoso
Extensión del daño	Lesiones discontinuas	Lesiones continuas
Áreas comprometidas	Principalmente el íleon y, de forma secundaria, el colon	Principalmente el recto y el hemicolon izquierdo
Diarrea	Frecuente	Frecuente
Sangrado rectal	Raro	Frecuente
Fístulas	Frecuentes	Raras
Estenosis	Frecuente	Rara
Abscesos perianales	Frecuentes	Raros
Desarrollo de cáncer	Poco frecuente	Relativamente frecuente

### Enfermedad de Crohn

Una característica de la enfermedad de Crohn corresponde a las lesiones granulomatosas bien delimitadas y circundadas por tejido mucoso. Las complicaciones de esta patología incluyen la formación de fístulas, desarrollo de abscesos abdominales y obstrucción intestinal. Las fístulas entre los segmentos del tubo GI pueden conducir al desarrollo de malabsorción, síndromes por sobrecrecimiento bacteriano y diarrea. Dado que las sales biliares se absorben en un tramo relativamente corto del íleon terminal, y las lesiones en este nivel causan un aumento de sales biliares al colon, se produce diarrea colerética. Si la pérdida de sales biliares es cuantiosa (por afectación muy extensa del íleon), además de diarrea colerética puede existir esteatorrea, ya que las sales biliares son esenciales en la absorción de las grasas.

### Laboratorio

En la enfermedad de Crohn se producen con frecuencia zonas estenóticas que promueven el sobrecrecimiento bacteriano y, en algunos casos, la lesión de la mucosa

condiciona la aparición de intolerancia a la lactosa. En las heces puede encontrarse sangre oculta, moco o pus. En las fases activas es conveniente descartar la sobreinfección y realizar un estudio microbiológico. La calprotectina fecal permite identificar a pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal.

### **Colitis ulcerosa**

Es una condición inflamatoria inespecífica que se limita al recto y al colon. Se caracteriza por la presencia de lesiones que se forman en las criptas de Lieberkühn, en la base de la capa mucosa. El proceso inflamatorio tiende a la formación de hemorragias mucosas puntiformes, que con el tiempo presentan supuración y se convierten en abscesos crípticos. Estas lesiones inflamatorias pueden desarrollar necrosis y ulcerarse.

Las manifestaciones clínicas se refieren al dolor cólico intestinal leve e incontinencia fecal; anorexia, debilidad y tendencia a la fatiga son comunes. Presenta de manera típica desórdenes reincidentes marcados por cuadros de diarrea que pueden persistir días, semanas o meses, y luego ceder, para reincidir después de un intervalo asintomático.

### **Laboratorio**

En las fases activas de la enfermedad en el hemograma se observa leucocitosis con neutrofilia. Los reactantes de fase aguda o de inflamación como proteína C reactiva y el fibrinógeno se encuentran elevados y son los más utilizados en la práctica clínica. En los casos más graves de dilatación del colon (megacolon tóxico) se puede objetivar leucopenia, trombocitemia y aumento de la VSG en el contexto de sepsis. El paciente puede cursar con anemia ferropénica y es poco frecuente la anemia macrocítica por pérdida de folatos. En casos graves se evidencia hipoalbuminemia, hipopotasemia, acidosis metabólica, hipocalcemia e hipomagnesemia.

Los p-ANCA suelen estar elevados, aunque su determinación resulta muy inespecífica para diferenciar entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn en una biopsia con diagnóstico histológico de «colitis indeterminada». La colitis ulcerosa puede asociarse a colangitis esclerosante primaria, con elevación de las enzimas de la colestasis (fosfatasa alcalina y GGT). En el estudio de las heces puede encontrarse sangre, moco y pus.

### **Enteropatía perdedora de proteínas**

La pérdida de cantidades significativas de proteínas séricas hacia el lumen intestinal y su posterior paso a las heces es consecuencia de varios trastornos GI. Estos pueden estar asociados con inflamación o ulceración de un segmento del intestino delgado o grueso (como en la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) o estómago, con enfermedades en las

que los vasos linfáticos intestinales están obstruidos o donde la presión linfática es elevada (linfoma, enfermedad de Whipple), o con trastornos asociados con alteración estado inmunitario, como lupus eritematoso sistémico y algunas alergias alimentarias.

En el intestino sano, la proteína fecal se deriva de los enterocitos que se desprenden de la superficie de la mucosa y de secreciones del intestino. El diagnóstico de enteropatía perdedora de proteínas debe ser considerado en pacientes con hipoalbuminemia en quienes la pérdida renal, la enfermedad hepática y la desnutrición han sido excluidas.

La pérdida de proteínas enteral debe ser directamente demostrable mediante la medición de la  $\alpha$ 1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT). AT es una glicoproteína que se sintetiza en el hígado y se encuentra en el suero en una concentración de 1,5 a 2 g/L. Es un inhibidor de la proteasa y por lo tanto es resistente a la degradación por enzimas proteolíticas en el tracto GI. La concentración de AT se determina en una muestra fecal y en suero. Las heces deben recolectarse por 3 días, en envases prepesados y con la refrigeración adecuada. El AT se extrae en solución salina antes del análisis.

En la EII, la eliminación de AT puede alcanzar valores altos (200 mL/d); esto representa una pérdida de aproximadamente 6 g de albúmina/d. El aclaramiento de AT debe interpretarse con precaución en pacientes con pruebas de sangre oculta en heces positivas, ya que la pérdida de sangre podría ser suficiente para aumentar falsamente el aclaramiento. AT en heces y suero se puede medir por inmunodifusión radial.

## **OTRAS PATOLOGÍAS INTESTINALES**

### **- Enfermedad diverticular**

La diverticulosis es una afección que con frecuencia se presenta en la región distal del colon descendente y el colon sigmoides, en la que la capa mucosa del colon se hernia a través de la capa muscular. En general, existen divertículos múltiples, la mayoría de los cuales se identifican en el colon sigmoides. La enfermedad diverticular es frecuente en la sociedad occidental y afecta a cerca del 40% de la población al llegar a los 60 años.

Los factores como la carencia de fibra en la dieta, la disminución de la actividad física y los hábitos intestinales deficientes (p. ej., hacer caso omiso de la urgencia para defecar), junto con los efectos del envejecimiento, contribuyen al desarrollo del trastorno.

La diverticulitis es una complicación de la diverticulosis, en la que existe inflamación y perforación macroscópica o microscópica del divertículo. Uno de los malestares más frecuentes es el dolor en el cuadrante inferior izquierdo, que se acompaña de náuseas y vómitos; febrícula y la elevación del conteo leucocitario. Estos síntomas suelen persistir varios días, a menos que se presenten complicaciones, y tienden a derivar de la inflamación

localizada de los divertículos, con perforación y desarrollo de abscesos pequeños. Entre las complicaciones, se encuentran la perforación con peritonitis, hemorragia y obstrucción intestinal.

#### **- Obstrucción intestinal**

Se refiere a la alteración del movimiento del contenido intestinal en dirección distal. Las causas se pueden clasificar como mecánicas o paralíticas. Este trastorno puede producir estrangulación con necrosis intestinal, lo cual conduciría a una perforación, peritonitis y septicemia. La obstrucción mecánica puede derivar de alteraciones intrínsecas o extrínsecas, que afectan la permeabilidad de la luz intestinal. Las etiologías posquirúrgicas, como la hernia externa (p. ej., inguinal, femoral o umbilical) y las adherencias posquirúrgicas, son responsables del 75% de las obstrucciones intestinales. Otras causas menos frecuentes son las estenosis y los tumores.

#### **- Gastroenteritis infecciosa**

La gastroenteritis es la disfunción y/o la inflamación intestinal que pueden cursar en forma aguda o crónica. Los síntomas GI gastrointestinales más frecuentes son las náuseas, vómitos y diarrea acompañada o no de fiebre. La mayoría de los casos son de etiología infecciosa provocada por un microorganismo (bacterias, virus, parásitos o protozoos) o sus toxinas (enterotoxinas, citotoxinas, neurotoxinas). Además, puede producirse gastroenteritis después de la ingestión de fármacos y tóxicos químicos (p. ej., metales pesados, sustancias vegetales). La adquisición puede ser transmitida por los alimentos, el agua, de persona a persona, o en ocasiones a través de la diseminación zoonótica.

El mecanismo del daño puede ser no inflamatorio, y estaría vinculado a la producción de enterotoxinas (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Cryptosporidium*, etc.), mientras que otras veces el mecanismo es de naturaleza inflamatoria, por la acción enteroinvasiva de los gérmenes o por su capacidad productora de citotoxinas (*Salmonella*, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroinvasiva, *Shigella*, *rotavirus*, *Entamoeba histolytica*, etc.). En ocasiones, el mecanismo es mixto (*Aeromonas*, *Giardia lamblia*, etc.).

Los detalles de este tema se desarrollan en las asignaturas correspondientes.

#### **- Cáncer de Colon**

El tema cánceres del colon y el recto se describe en la Guía Teórico-Práctica de Bioquímica Clínica 1, parte 2, año 2022.

**Luego de estudiar el material de este capítulo, el estudiante estará en condiciones de resolver los siguientes Casos Clínicos:**

1- Masculino de 54 años de edad acude a urgencias por dolor abdominal. Antecedentes personales patológicos: hipertensión arterial sistémica, colon irritable en tratamiento. Exploración física: signos vitales dentro de parámetros normales. Abdomen blando depresible globoso a expensas de panículo adiposo, peristalsis normoactiva, con dolor a la palpación profunda en fosa iliaca derecha.

Estudios de laboratorio: leucocitos  $11.300/\text{mm}^3$ , neutrófilos  $9.000/\text{mm}^3$ , hemoglobina 15g/dL, Hto 45%, plaquetas  $203000/\text{mm}^3$ , glucosa 107g/dL, creatinina sérica 0,90mg/dL, LDH 345UI/L, amilasa sérica 68U/L, bilirrubina total 0,85  $\mu\text{mol/L}$ . Examen orina completo: nitritos negativos, leucocitos negativos, bacterias moderadas, mucina abundante. Se realiza colonoscopia: Colon sigmoides redundante, resultado histopatológico: inflamación crónica inespecífica.

- a) ¿Qué diagnóstico presuntivo podría proponer?
- b) Explique la fisiopatología de la enfermedad propuesta en el punto a.
- c) ¿Qué otros marcadores podrían cuantificarse?

2- Varón de 66 años, raza blanca, sin antecedentes familiares relevantes. No presenta alergias conocidas. Diagnosticado de Diabetes Mellitus tipo II, hipercolesterolemia, hipertensión arterial, hiperuricemia y sobrepeso. Tratamiento actual: Inhibidor de la bomba de protones, diurético, antihipertensivo, antidiabéticos orales, antiagregante plaquetario y uricosúrico.

Los resultados de laboratorio confirman sangre oculta en heces y anemia ferropénica.

- a) ¿Qué diagnóstico presuntivo propone?
- b) ¿Qué patologías debería considerar para hacer un diagnóstico?
- c) ¿Qué otros parámetros bioquímicos se deberían cuantificar?
- d) ¿Qué estudio de imágenes confirmaría el diagnóstico?

3- Respecto a las características microscópicas y macroscópicas de las heces, señale la afirmación correcta:

- a. No suele darse esteatorrea en pacientes con una enfermedad celíaca.
- b. La esteatorrea se caracteriza por ser heces negruzcas y pegajosas.
- c. La creatorrea puede existir en la insuficiencia pancreática.
- d. En la amilorrea, las cifras de amilasa en las heces están muy aumentadas.
- e. Todas las respuestas son verdaderas.

4- Con respecto a las pruebas de absorción de hidratos de carbono, señale la respuesta INCORRECTA:

- a. En la prueba de la d-xilosa pueden aparecer falsos positivos en pacientes con insuficiencia renal.
- b. En la prueba de la d-xilosa, la toma de indometacina altera los resultados de la prueba.
- c. El sobrecrecimiento bacteriano nunca altera el test de aliento para intolerancia a la lactosa.
- d. En el test de hidrógeno del aliento, un aumento superior a 20 partes por millón (ppm) es diagnóstico de intolerancia a la lactosa.
- e. Todas las respuestas son correctas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Burtis, C., Ashwood, E., Bruns, D. (2015). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (7th Ed). Madrid, España: Elsevier
- Henry, J.B. (2010). El laboratorio en el diagnóstico clínico (20° Ed). México: Marbán.
- Kumar, V., Abbas, A., Aster, J. (2018). Robbins. Patología Humana (10ª Ed). España: Elsevier.
- Norris, T. (2020). Porth. Fisiopatología. Alteraciones de la salud: Conceptos básicos (10ª Ed). España: Wolters Kluwer.
- Prieto Valtueña, J., Yuste, J. (2019). Balcells. La clínica y el laboratorio (23ª Ed). España: Elsevier.
- Chahuan, J., Pizarro, M., Riquelme, A. (2022). Métodos diagnósticos para la detección de infección por *Helicobacter pylori*. ¿Cuál y cuándo deben solicitarse?. Acta Gastroenterol Latinoam 52: 36-46.
- Álvarez, A., Fernández Real, J., Guarnere, F. (2021). Microbiota intestinal y salud. Gastroenterología y Hepatología 44: 519-535.
- Moreno, M. (2020). Abordaje diagnóstico de la diarrea crónica. Acta Gastroenterol Latinoam 50(4): 388-414.
- Román Riechmanna, E., Castillejo, G., Cilleruelo M. (2020). Aplicación racional de los nuevos criterios de la European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) 2020 para el diagnóstico de la enfermedad celíaca. An Pediatr (Barc) 92(2): 110.e1---110.e9.
- Li, JN., Yuan SY. (2019). Fecal occult blood test in colorectal cancer screening. J Dig Dis 20(2): 62-64.

## CAPÍTULO IV LÍQUIDOS DE PUNCIÓN



### OBJETIVOS

- Adquirir conocimientos sobre el estudio integral de los líquidos de punción y de las alteraciones asociadas a patología humana.
- Conocer las técnicas, procedimientos y marcadores para la identificación de los diferentes líquidos: pericárdico, ascítico, pleural y cefalorraquídeo.
- Integrar los conocimientos adquiridos e interpretar los resultados de los estudios de laboratorio bioquímico con la clínica.

### INTRODUCCIÓN

El estudio de los líquidos de punción representa ciertos desafíos para el laboratorio clínico. Este documento contiene recomendaciones para el análisis químico y celular de los líquidos, contribuye a la estandarización, y proporciona información sobre valores de referencia, correcta manipulación, transporte y procesamiento. Cabe mencionar que los diversos constituyentes de los líquidos interactúan en forma dinámica para mantener el equilibrio corporal. Si bien la concentración de ciertos analitos es similar a la plasmática, al igual que la actividad enzimática, cada uno de ellos presenta características propias.

En este capítulo se seleccionaron los líquidos de mayor interés y más frecuente de análisis en el laboratorio, que aportan al diagnóstico y evaluación de diversas patologías, como los líquidos: cefalorraquídeo, pleural, pericárdico, peritoneal y sinovial.

## LÍQUIDOS DE DERRAMES EN CAVIDADES SEROSAS

### Definición y mecanismos de formación

A partir de la cavidad celómica embrionaria se originan las cavidades serosas, limitadas por una hoja parietal y otra visceral. La hoja visceral tapiza al órgano en cuestión, y la parietal se une a estructuras extra-visceralas que permiten sostener al órgano en su ubicación normal. Estas **membranas serosas** dejan normalmente un espacio mínimo entre ambas, por lo que dichas cavidades son virtuales (en pleura sólo hay alrededor de 15-20 mL de líquido, en peritoneo 100 mL y en pericardio 20 mL). La **pleura** envuelve pulmones, el pericardio al corazón y el peritoneo los órganos abdominales. Las cavidades son cerradas, a excepción de la peritoneal que recibe el extremo de la trompa de Falopio. Las serosas son

tapizadas por una sola capa de células mesoteliales, que descansan sobre una capa de tejido conectivo con vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (Fig. 1 y 2).

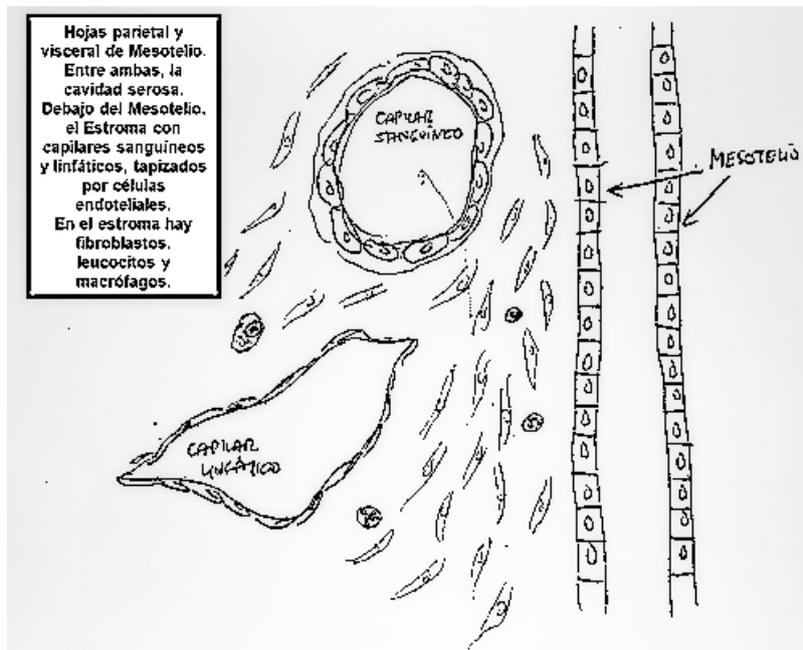


Figura 1. Esquema de mesotelio y estroma subyacente (autor: Dr. Luis Palaoro)

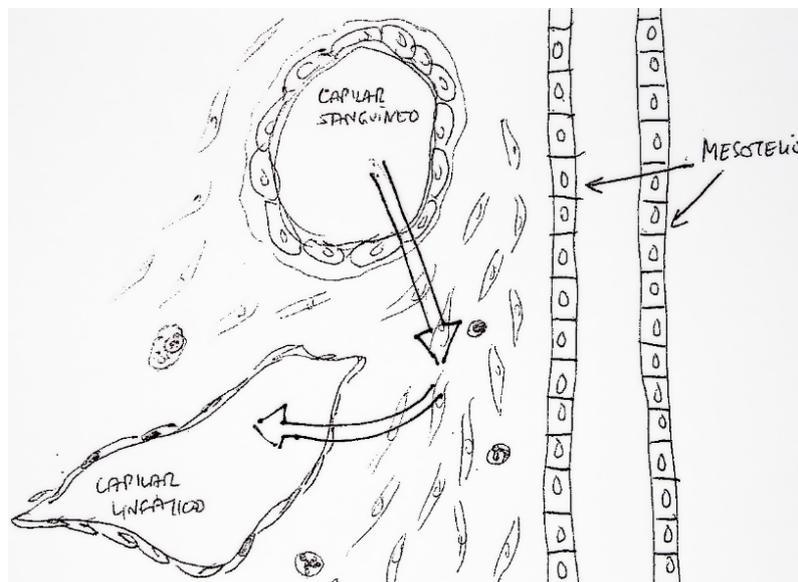


Figura 2. Escenario normal: el líquido filtrado desde los capilares sanguíneos pasa al estroma, donde es recogido por los linfáticos (autor: Dr. Luis Palaoro)

Cuando aumenta en forma patológica el contenido de líquido en las cavidades se habla de **efusiones o derrames**, que en el caso de peritoneo se denominan **ascitis**. En pleura se reabsorben diariamente 1000 mL de líquido por linfáticos; cuando la filtración excede la reabsorción se produce el derrame.

Es de gran utilidad el análisis citológico de estos líquidos, que deben ser obtenidos por punción y colectados en tubos con heparina. Las efusiones son clasificadas según su contenido proteico y el nivel de LDH, lo que se relaciona con los mecanismos de su formación. De esta manera se las clasifica como **trasudados o exudados**.

Los **trasudados** se producen por filtración de sangre a través de una pared vascular físicamente intacta. La presión osmótica del suero es importante para mantener la salida del filtrado plasmático dentro de límites normales, siendo la albúmina la principal responsable del mantenimiento de la volemia en relación al resto de las proteínas séricas, debido a su bajo peso molecular (PM, que asegura mayor número de moléculas para un peso dado). La disminución de la presión osmótica o el aumento de la presión hidrostática son las causas de trasudado (hipoproteinemias por desnutrición, cirrosis hepática, falla cardíaca congestiva). La obstrucción de los conductos linfáticos también origina trasudados (tumores, radiación, fibrosis, etc). Generalmente son muestras hipocelulares y rara vez contienen células neoplásicas, aunque hay excepciones. El pH de los trasudados es relativamente alto (Fig. 3 y 4).

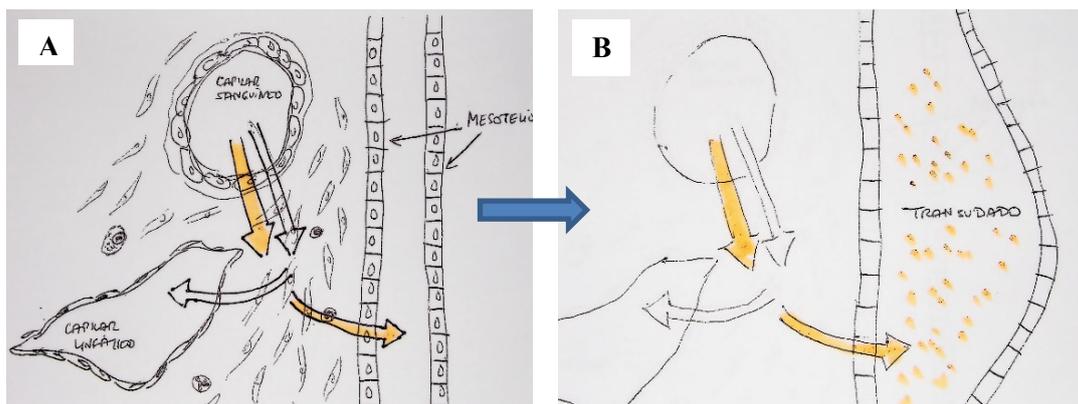


Figura 3. TRASUDADO. Aumento de la presión hidrostática o disminución de la presión osmótica aumentan el volumen filtrado, que no puede ser recogido por los linfáticos, desembocando en la cavidad serosa (A), originando un Trasudado (B) (autor: Dr. Luis Palaoro).

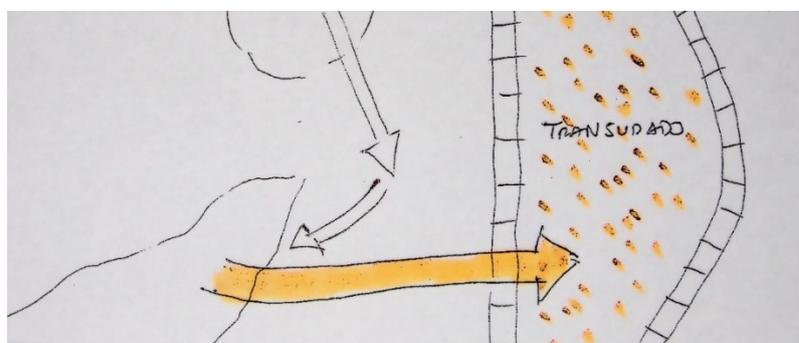


Figura 4. TRASUDADO. La otra causa es la obstrucción de los linfáticos (autor: Dr. Luis Palaoro).

En los **exudados** se produce daño de paredes vasculares, y su origen puede ser inflamatorio o tumoral. Las inflamaciones casi siempre son secundarias a procesos inflamatorios de los órganos contenidos, como ocurre en la pleuritis luego de neumonía, tuberculosis, infarto pulmonar, peritonitis, pericarditis en enfermedad cardíaca reumática. Por ejemplo, la presencia de gérmenes en las proximidades de la pleura produce reclutamiento de macrófagos y neutrófilos, que liberan sustancias oxidantes que dañan las membranas del endotelio de los capilares, que extravasan líquido al intersticio, que por presión hidrostática llenará luego el espacio pleural, pericárdico o peritoneal. El pH de los exudados es relativamente bajo (Fig. 5 y 6).

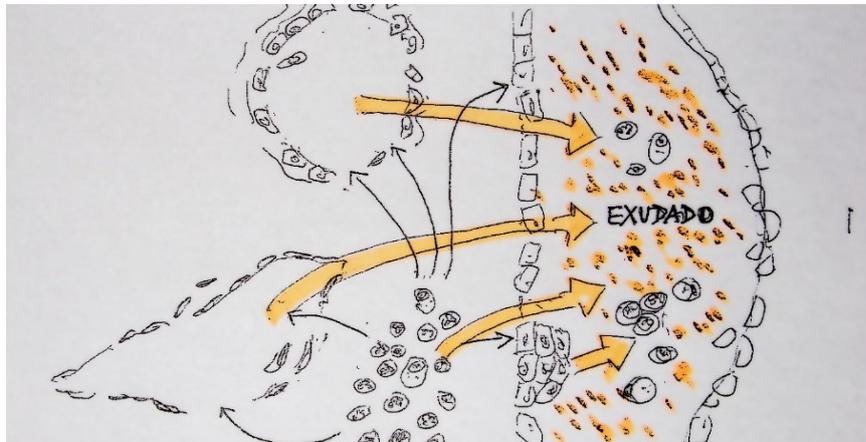


Figura 5. EXUDADO de origen inflamatorio: aumenta el N° de neutrófilos y macrófagos en el estroma, que liberan interleuquinas que producen daño en paredes de capilares y en mesotelio (suele reaccionar con hiperplasia). Se libera líquido con alta concentración de proteínas y abundantes células (autor: Dr. Luis Palaoro).

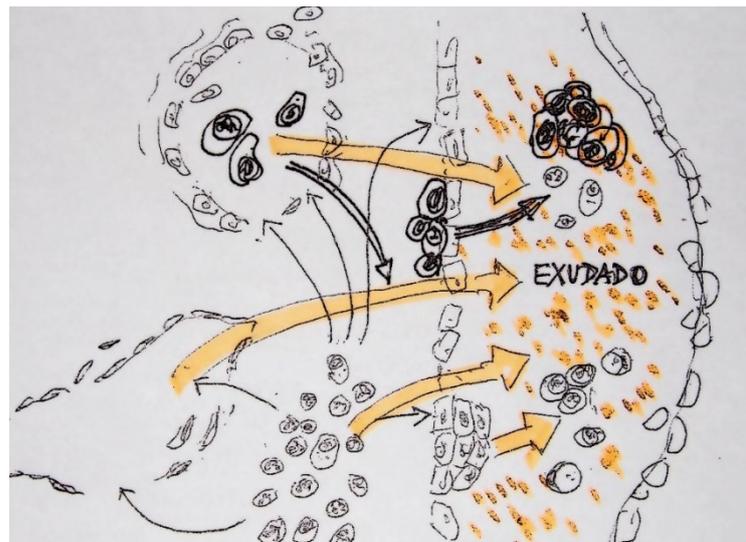


Figura 6. EXUDADO de origen neoplásico: Las células neoplásicas llegan por los capilares, los atraviesan y se siembran sobre mesotelio, desprendiéndose a la cavidad serosa. El estroma inflamatorio libera interleuquinas que afectan las paredes capilares. El mesotelio suele hacer hiperplasia. El líquido, rico en proteínas, tiene abundantes células.

## CRITERIOS DIFERENCIALES ENTRE TRASUDADOS Y EXUDADOS

Es importante establecer si el líquido es trasudado o exudado: en el primer caso, se trata de una falla sistémica en el equilibrio hídrico, con mesotelio indemne. Se corrige la falla y no se realizan más estudios sobre el mesotelio. Pero en el segundo caso, debe investigarse el origen (inflamatorio o neoplásico), lo que conduce a realización de exámenes complementarios, como exámenes bioquímicos, citológicos, cultivos, marcadores oncológicos, estudio de imágenes, etc.

Los criterios de Light, Boyer y de Meyer son de gran utilidad como criterios diferenciales.

- Criterios de Light (para derrames pleurales). Se considera **exudados** a los líquidos de derrame con contenido proteico superior a 3 g/dL, y/o relación LDH líquido/suero (L/S) superior a 0,6; **trasudados** serán los que tengan menos de 3g/dL de proteínas y/o la relación LDH L/S sea inferior a 0,6. (Otros criterios: relación proteica L/S > 0,5 es exudado, < 0,5 es trasudado --- relación LDH L/S > 2/3 del límite superior en suero: exudado y < 2/3 del límite superior en suero: trasudado).

- Criterios de Boyer (para ascitis). Son semejantes a los de Light, pero se aplican a ascitis. Sólo utiliza valores absolutos de LDH: < 400 UI/L trasudado y > 400 UI/L exudado.

- Criterios de Meyer (para derrames pericárdicos). Son semejantes a los anteriores, pero propone LDH  $\geq$  300 U/L para exudado.

**Gradiente de Albúmina (GASA):** las proteínas pueden dar falso diagnóstico de exudado en pacientes con trasudados que han recibido diuréticos, los que al eliminar agua aumentan la concentración de las proteínas en el líquido, que abandonan el espacio pleural más lentamente.

Si clínicamente se sospecha trasudado pero el criterio de Light indica exudado, la realización de **GASA** (diferencia entre los valores de la Albúmina sérica y del líquido) es útil, ya que la mayoría de los pacientes con valores mayores a 1,1 g/dL presentan trasudados.

## ETAPA PRE-ANALÍTICA, ANALÍTICA Y POS-ANALÍTICA

- **Etapa preanalítica:** la punción está a cargo del médico tratante.

Preparación del paciente: rotación adecuada para evitar la sedimentación de los componentes celulares en el caso de ascitis.

Punción con anticoagulante:

Heparina: 5-10 U/mL de líquido

Citrato de Sodio 3,8%: 1mL/10mL de líquido

EDTA: 1mg/mL de líquido

Forma de envío al laboratorio: 3 tubos estériles

- Examen físico-químico y citológico: realizar antes de 2 h de recibido a temperatura ambiente.
- ADA (Adenosindeaminasa): se conserva su actividad hasta 48 h en heladera.
- Cultivo: realizar antes de las 24 h a temperatura ambiente.
- Tomar simultáneamente una muestra de sangre.
- Determinación de pH del líquido: en anaerobiosis, refrigerado y enviado de inmediato al laboratorio.

Errores más frecuentes de la etapa pre-analítica: administrativos (tubo colector sin identificación) o técnicos (muestra coagulada, hemorrágica, con más de 2 h de obtención).

- **Etapa analítica:** Los exámenes que se realizan son los siguientes:

- I) Físico-químico: Aspecto y parámetros bioquímicos
- II) Examen Citológico: Recuento celular total y diferencial
- III) Examen Bacteriológico
- IV) Otros estudios: inmunonológicos, parasitológicos, marcadores oncológicos

I) El aspecto es un útil orientador para los estudios subsiguientes. Los trasudados son por lo general límpidos, de color amarillo claro. En contraste, los exudados son por lo general turbios, de color amarillo oscuro, o rojizos, o lechosos, o verdosos. Es importante observar la viscosidad de la muestra.

El primer examen químico es el dosaje de proteínas y de LDH de líquido y suero para diferenciar trasudados de exudados (y de albúmina si es necesario). Estos estudios se hacen sobre el sobrenadante del líquido pos-centrifugado, por lo tanto se realizan luego del examen citológico (ver más adelante: Centrifugación de los líquidos de punción-coloraciones). También pueden practicarse otras determinaciones para patologías específicas (ver más adelante).

II) El examen citológico comienza colocando una gota del líquido entre porta y cubre (como si se tratara de una muestra de orina) para ser observada al microscopio. Esto permite tener una idea de la dilución a realizar para el posterior recuento en cámara, y observar la presencia de células o grupos celulares diferentes a células mesoteliales o leucocitos (Fig. 7 y 8).

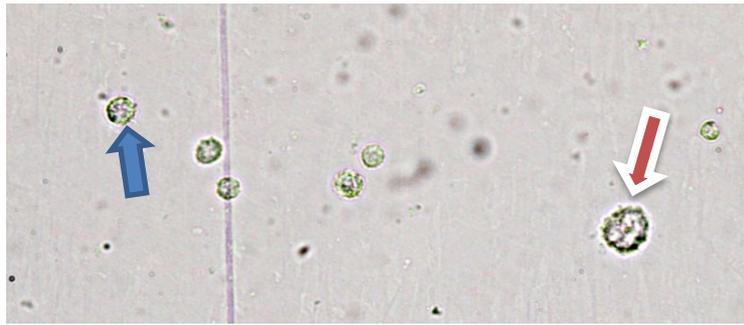
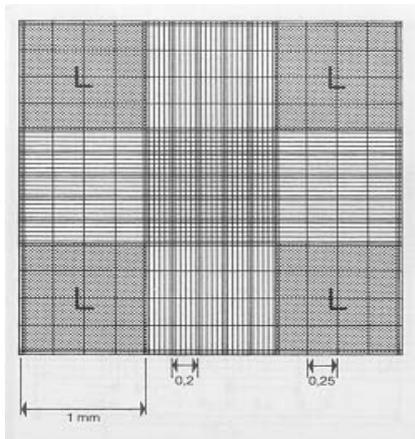


Figura 7. Líquido de punción en fresco. La flecha azul señala un leucocito, y la roja una célula mesotelial. (Observar tamaños comparativos) (40x) (autor: Dr. Luis Palaoro)



Figura 8. Líquido de punción en fresco. Se observa, en un campo con hematíes, un grupo celular "sospechoso", que requerirá estudios especializados para su citodiagnóstico (ver más adelante) (40x) (autor: Dr. Luis Palaoro)

### Recuento en cámara de Neubauer



Se cargan con el líquido las dos partes de la cámara (a la izquierda sólo se muestra una).  
Se cuentan los elementos de las zonas marcadas con L en las dos cámaras y se promedian. A ese número se llamará **N**. A la inversa de la dilución empleada, que se deducirá de la observación en fresco, se lo llamará **D**.  
Se aplica la fórmula:

$$\mathbf{NxDx10 = células / mm^3}$$

Puede informarse el N° de células totales, sin discriminar la estirpe. En general, si se trata de trasudados, el número de células mesoteliales es bajo, y casi todos los elementos son leucocitos. Pero si hay una importante cantidad de células mesoteliales, debe diferenciarse el recuento de leucocitos y de células mesoteliales.

El recuento celular es importante porque también agrega un criterio para diferenciar trasudados de exudados:

- **Los trasudados de ascitis cursan con menos de 300 células/mm<sup>3</sup>.**
- **Los trasudados de pleura cursan con menos de 500 células/mm<sup>3</sup>.**

## RECUESTO MANUAL O AUTOMATIZADO

Hasta ahora se habló del recuento manual en cámara. En la actualidad se dispone de aparatos automatizados validados para líquidos de punción que arrojan resultados similares siempre y cuando las células no se encuentren agrupadas (Fig. 8 y 9).

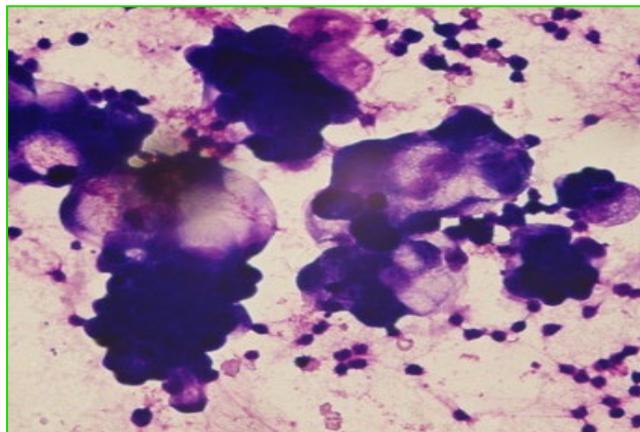


Figura 9. Líquido de punción con gran número de grupos celulares incontables en un aparato automatizado o en cámara (coloración de Giemsa, 40x). (autor: Dr. Luis Palaoro)

En casos de abundantes grupos celulares, ningún método puede dar resultados confiables, sin embargo, el método manual permite en ocasiones, discernir el número de células que forman los grupos, logrando una mejor aproximación. De todas maneras, el informe debe aclarar que el N° de células debe ser mayor que el informado, debido a la presencia de abundantes grupos celulares.

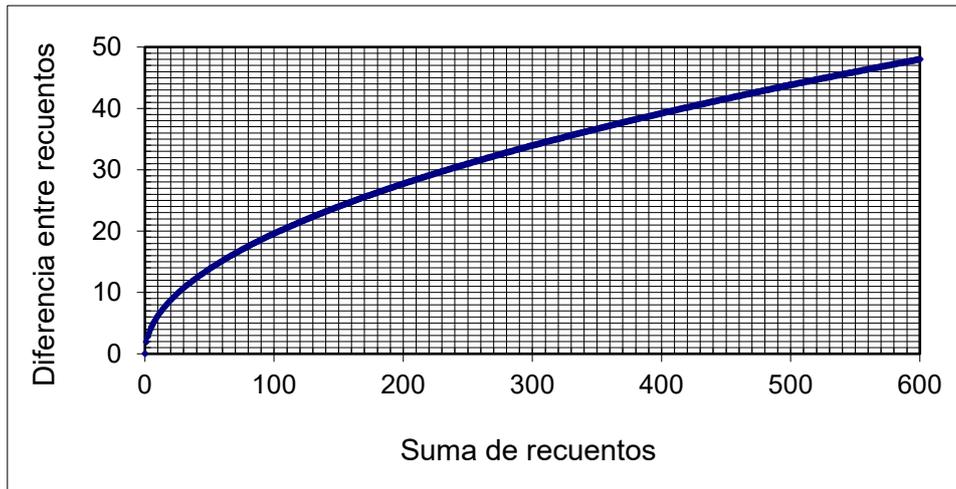
## VALIDACION DEL RECUESTO CELULAR EN LIQUIDOS DE PUNCIÓN

Como se explicó, el recuento debe hacerse por duplicado y se informa el promedio. El resultado ¿es significativo?: Por ejemplo, si se hacen dos recuentos y los resultados son (en N° de células /mm<sup>3</sup>): 84 y 140 ¿es válido promediar esos dos valores e informar 112? ¿o los dos valores están demasiado dispersos para poder ser promediados?

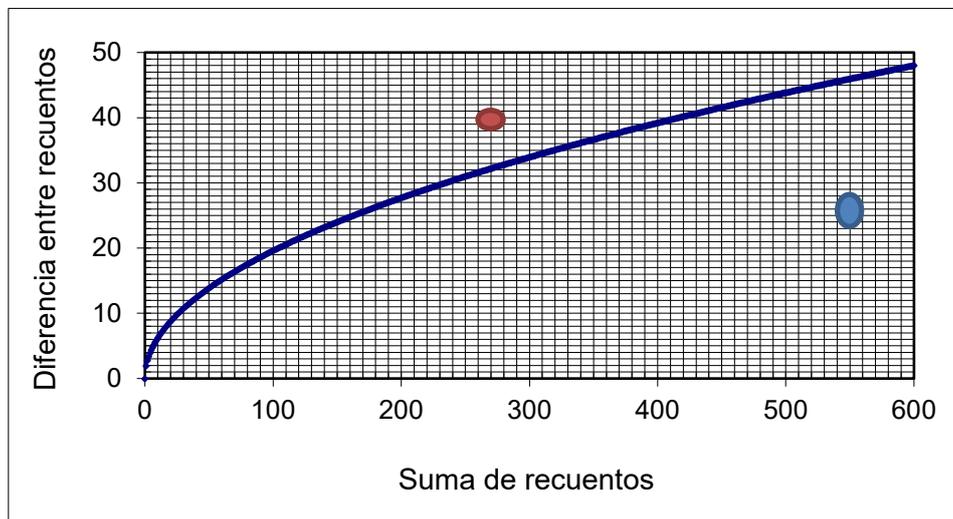
### Para validar el recuento se utiliza el gráfico siguiente:

Se cuentan dos cámaras, y antes de aplicar la fórmula para el cálculo del recuento, se calcula la suma y las diferencias de los dos recuentos.

En el gráfico (diferencias de recuentos en función de las sumas) se marca el valor de la diferencia en el eje Y, y el valor de la suma en el eje X. El punto que se genera debe caer POR DEBAJO DE LA CURVA para que el recuento tenga validez.



Ejemplo:



Los dos recuentos son: 160 y 120. La diferencia es 40, y la suma 280. Esto determina el punto **rojo** en el gráfico. Por estar por encima de la curva, el recuento es inválido, no pueden promediarse los recuentos.

Los dos recuentos son: 250 y 280. La diferencia es 30, y la suma 530. Esto determina el punto **azul** en el gráfico. Por estar debajo de la curva, el recuento es válido y pueden promediarse los recuentos (Promedio: 265).

### **CENTRIFUGACIÓN DE LOS LÍQUIDOS DE PUNCIÓN- COLORACIONES**

Luego de la observación en fresco y del recuento celular, el líquido se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos, y se realizan varios extendidos con el sedimento (el sobrenadante se utiliza para los estudios químicos).

Uno de los extendidos se deja secar al aire, se fija con metanol y se colorea con Giemsa para realizar el recuento diferencial. Nunca se debe intentar hacer el examen diferencial en fresco; los elementos se deforman y no pueden diferenciarse neutrófilos de linfocitos.

Los otros extendidos se dejan concentrar al aire hasta consistencia siruposa (hasta que se comiencen a secar los bordes), y se los introduce cuidadosamente en etanol de 96°, para conservarlos para técnicas especiales si fuera necesario (por ejemplo, coloración de Papanicolaou). Pueden conservarse el alcohol hasta 1 mes.

- **Sedimento de líquido de punción coloreado con Giemsa** (Fig. 10 y 11).

- Las **células habituales** en los líquidos son: Leucocitos – Hematíes – Macrófagos - Células mesoteliales- Células Mesoteliales Reactivas.

- **Otras células:** Cuando no sea posible identificarlas (profesional no especializado en Citología), conservar los extendidos en alcohol de 96° para su estudio posterior (Coloración con Papanicolaou).



Figura 10. Células del Líquido de punción (Giemsa, 40x).

La célula mesotelial normal tiene aproximadamente el doble del tamaño de un neutrófilo, con un núcleo grande, generalmente central, con fina cromatina. Comparar con el linfocito y el neutrófilo del mismo campo. (autor: Dr. Luis Palaoro)

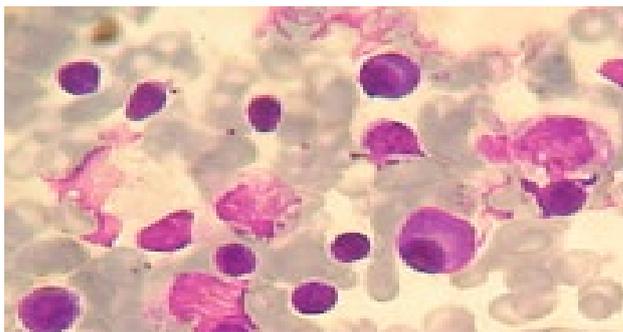


Figura 11. Células del Líquido de punción (Giemsa, 40x).

En este campo se distinguen linfocitos, células plasmáticas y abundantes hematíes (autor: Dr. Luis Palaoro)

**Células mesoteliales reactivas:** como se describió anteriormente, el mesotelio puede sufrir HIPERPLASIA como respuesta a interleuquinas tanto en exudados como en trasudados (ver definición y mecanismos de formación).

La Hiperplasia consiste en la transformación de la única fila de células mesoteliales en varias filas, donde cada célula conserva su morfología habitual, o puede sufrir ligeras modificaciones (Fig. 12).

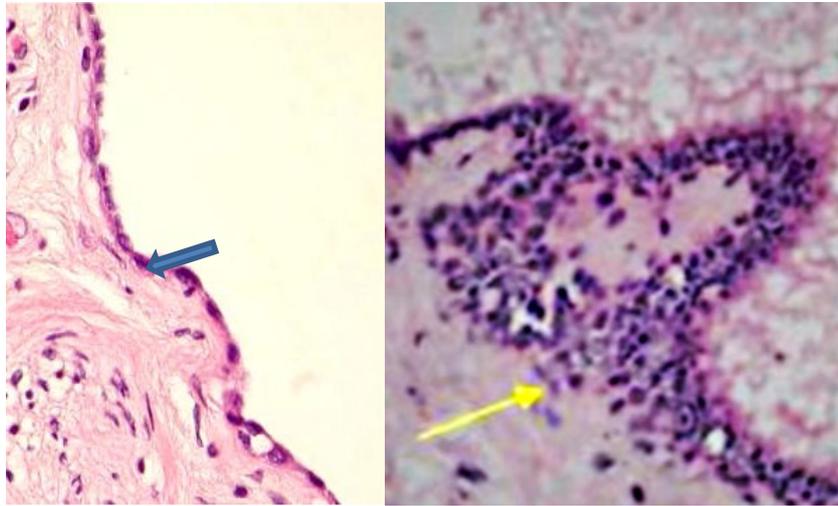


Figura 12. Izquierda: Mesotelio normal; una sola fila de células mesoteliales (flecha azul). Derecha: Hiperplasia mesotelial: varias filas de células mesoteliales (flecha amarilla) (Biopsia de pleura, 40x). (autor: Dr. Luis Palaoro)

Las células mesoteliales reactivas exfolian a las cavidades serosas principalmente en grupos. Las células que los forman pueden presentar ciertas alteraciones: núcleos agrandados, ligeramente hiper cromáticos, con leve aumento de la relación núcleo-citoplasma y citoplasmas a veces oscuros; pueden observarse nucléolos más evidentes y anisocariosis. La disposición de estos grupos es bidimensional (en un plano), lo que constituye un criterio útil para diferenciarlos de grupos neoplásicos, que son tridimensionales. Las células reactivas se vacuolizan con frecuencia, desplazando al núcleo hacia la periferia (falsos anillos de sello). (Fig. 13 y 14).

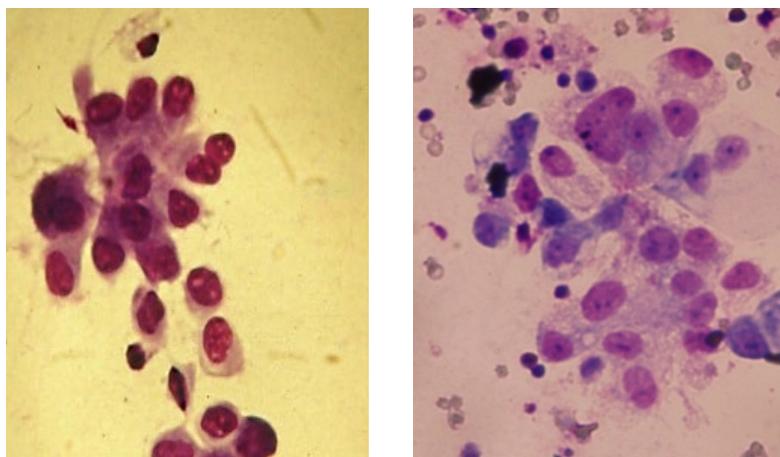


Figura 13. Células mesoteliales reactivas: Hiper cromatismo, disposición en un plano (izquierda). Anisocariosis, nucléolos evidentes, núcleos periféricos (Giemsa 40x). (autor: Dr. Luis Palaoro).

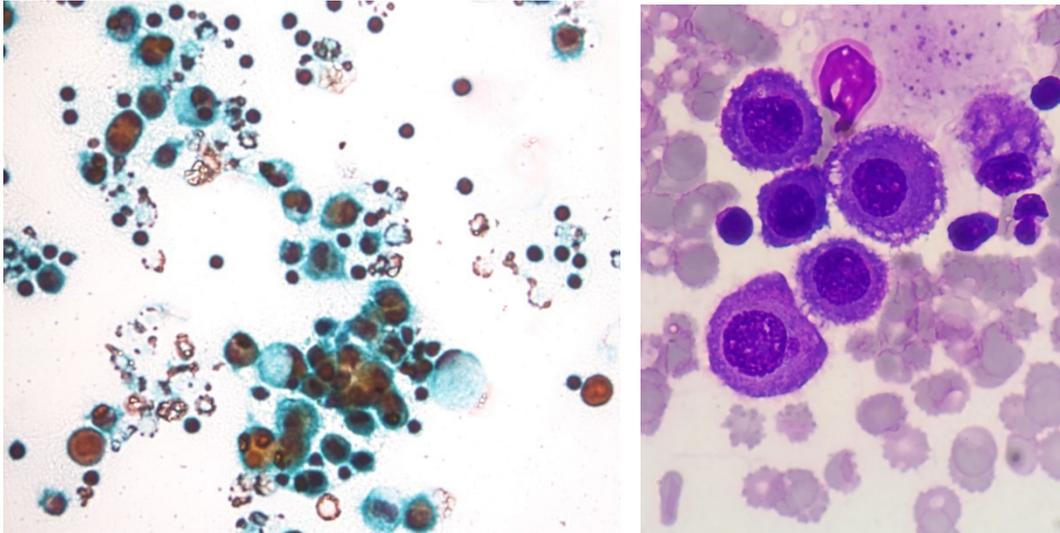


Figura 14. Izquierda: Células mesoteliales reactivas: Hiperchromatismo, anisocariosis, falsos anillos de sello (Papanicolaou 10x) – Derecha: Células mesoteliales reactivas con citoplasmas densos (Foto derecha tomada de LABOAtlas. Giemsa, 60x).

### INFORME DEL RECuento DIFERENCIAL

Para este informe, se calcula el porcentaje de los **tipos celulares leucocitarios** observados en los extendidos coloreados con Giemsa, como si fuera una fórmula sanguínea. Es un dato importante, porque el predominio de neutrófilos se relaciona con patologías inflamatorias, y el de linfocitos a patologías neoplásicas. Por supuesto que son criterios orientativos, no absolutos. El resto de las células (mesoteliales o mesoteliales reactivas, macrófagos) se informan de manera cualitativa (escasas, abundantes...)

### PATOLOGÍAS INVOLUCRADAS EN LOS DERRAMES

En las tres cavidades serosas pueden originarse trasudados o exudados. A continuación se muestran las patologías más frecuentes en cada una de las cavidades.

#### Cavidad pleural

Trasudados: Insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), cirrosis, síndrome nefrótico, urinotórax (orina en la cavidad pleural).

Exudados: Infecciones (neumonía, TBC), tromboembolismo pulmonar, colagenopatías, hemotórax, perforación esofágica, traumatismo de columna vertebral, obstrucción de conducto torácico (derrames quilosos), asbestosis, sarcoidosis, irradiación, neoplasias.

#### Cavidad peritoneal

Trasudados: Insuficiencia cardíaca congestiva, cirrosis, síndrome nefrótico.

Exudados: Infecciones (TBC, peritonitis bacteriana, absceso subfrénico o intrahepático), pancreatitis, rotura de vesícula biliar, obstrucción de conducto torácico, neoplasias.

**Cavidad pericárdica:**

Trasudados: Insuficiencia cardíaca congestiva, post-cirugía de tórax.

Exudados: Infecciones, neoplasias (mama o pulmón).

NOTA: se indica en color azul las patologías compartidas por las tres cavidades, debido a que son fallas del equilibrio hídrico, y por lo tanto sistémicas.

## DESCRIPCIÓN DE LAS PATOLOGÍAS BENIGNAS MÁS FRECUENTES

**ICC:** a partir de una deficiencia en el ventrículo izquierdo del corazón se producen modificaciones compensatorias: hipertrofia del corazón, aumento de la frecuencia, vasoconstricción periférica (sistema renina-angiotensina-aldosterona), que termina aumentando la retención de sodio y la presión en la red circulatoria del pulmón, con salida de líquido al intersticio que no puede ser reabsorbido por los linfáticos. La pérdida de la efectividad del bombeo cardíaco produce edemas en todo el cuerpo y derrames en serosas (Trasudados).

**Cirrosis:** hipertensión portal e hipoalbuminemia que produce disminución de líquido circulante, con activación de receptores de volemia que conducen a la liberación de aldosterona y renina (Trasudados). El aumento de la presión hidrostática hace que salga más líquido de la circulación hacia el espacio peritoneal (ascitis). Es importante la determinación de GASA para la confirmación de este diagnóstico.

**Urinotórax:** suele ser causado por una uropatía obstructiva que puede ocurrir a nivel de la vejiga urinaria o de la uretra (enfermedad de la próstata, quiste renal, trasplante de riñón, litotricia, cáncer del tracto urinario). La orina llega al espacio pleural retroperitoneal o a través de los vasos linfáticos retroperitoneales.

El diagnóstico requiere el dosaje de **creatinina** en el líquido pleural, que supera al valor en suero (generalmente más de 10 veces). Es de utilidad que el líquido tiene olor a amoníaco (Trasudados).

**Síndrome nefrótico:** la pérdida de proteínas desde los glomérulos renales, en especial de albúmina, disminuye la presión osmótica del plasma sanguíneo, originando trasudados.

**Tromboembolismo pulmonar:** formación de coágulos sanguíneos en una arteria pulmonar. En la mayor parte de los casos (95%) el trombo o coágulo se forma en las venas de los miembros inferiores y migra hasta la arteria pulmonar (Exudados).

**Colagenopatías:** poseen en general una base autoinmune, como el Lupus Eritematoso, la Artritis Reumatoidea y el Síndrome de Sjogren. Se producen infiltrados linfocitarios sub-pleurales, con formación de estructuras granulomatosas, con sincicios de macrófagos y células epitelioides (macrófagos elongados), siendo estos dos últimos tipos celulares los que se observan y caracterizan a estas efusiones. El Síndrome de Sjogren es una patología más generalizada, porque no sólo ataca pleura sino que también produce infiltrados linfocitarios en glándulas lacrimales (ojo seco) y salivales, además de comprometer el tejido conectivo de diversos órganos.

El aspecto de los líquidos de punción pleural es seroso, turbio y amarillento (recuerda al jugo de pomelo exprimido). Como se asocia a glucólisis anaeróbica, el ácido láctico está elevado y su pH es  $< 7,2$ . Los nódulos granulomatosos en la pleura se abren a la cavidad expulsando un material necrótico (Exudados). (Fig. 15)

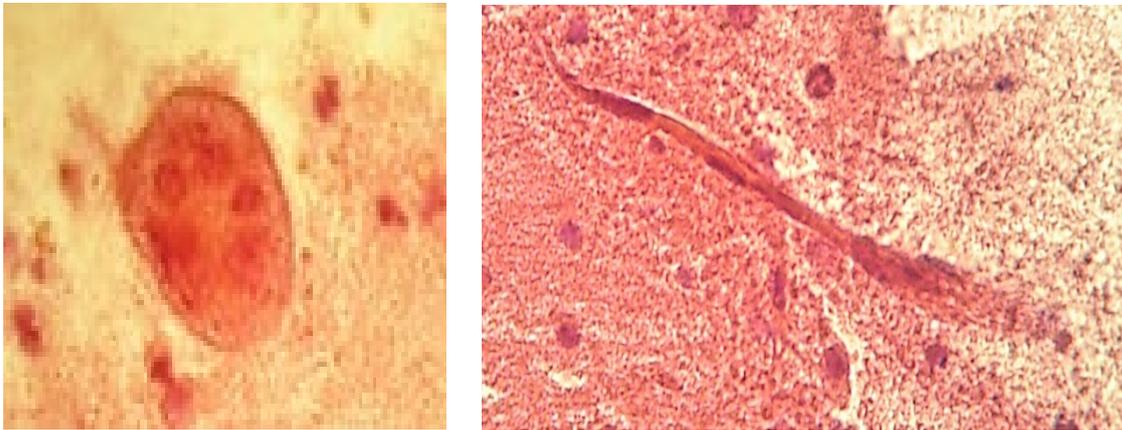


Figura 15. Colagenopatías: gran macrófago (izquierda) y célula epiteliode (derecha). El fondo del preparado es sucio por la presencia de material necrótico (Lupus eritematoso - Papanicolaou 40x). (autor: Dr. Luis Palaoro)

**Tuberculosis:** por debajo de la pleura, los granulomas tuberculosos se rompen y liberan bacilos y toxinas que interactúan con los linfocitos T sensibilizados, que responden con citoquinas inflamatorias que alteran la permeabilidad de los vasos pleurales, con la producción de derrame. Es característico el predominio linfocitario del derrame, la casi ausencia de células mesoteliales debido al depósito de fibrina que se forma sobre la pleura que impide su exfoliación, pudiendo observarse en pocas ocasiones, células de Langhans, que no son más que sincicios de macrófagos provenientes de los granulomas con sus núcleos dispuestos en la periferia.

La determinación de adenosindeaminasa (ADA) permite el diagnóstico de pleuritis tuberculosa si los niveles son  $>45\text{U/L}$ , con una sensibilidad del 97%. El problema es que no es totalmente específica y se eleva en empiemas, linfomas, lupus, artritis reumatoide y

pseudoquiste pancreático. La especificidad se eleva si el punto de corte se sitúa en 70U/L, perdiendo entonces sensibilidad (Exudados). (Fig. 16).

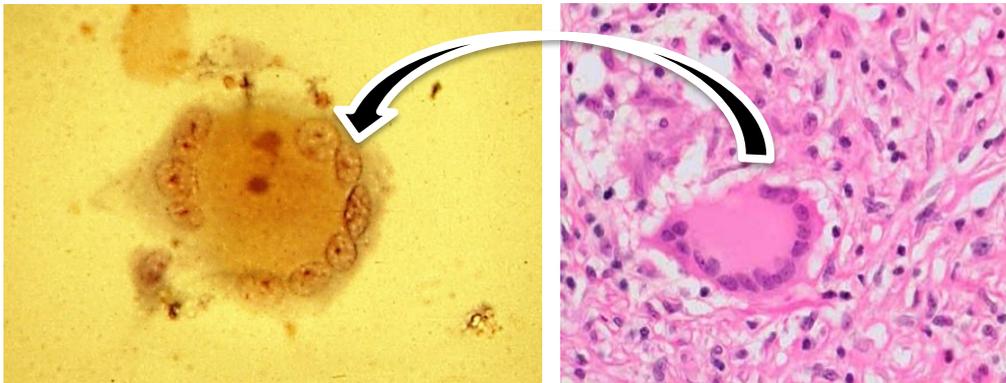


Figura 16. TBC: Biopsia de pleura con granuloma tuberculoso mostrando una célula de Langhan (derecha) y dicha célula en el líquido de punción pleural (izquierda) (H&E y Papanicolaou, 40x). (autor: Dr. Luis Palaoro)

**Pancreatitis:** debido a la inflamación se produce elevación diafragmática, disnea, y posible infiltración de pleura, resultando derrames mixtos, de peritoneo y de pleura. La determinación de amilasa es útil para el diagnóstico (Exudado).

**Perforación esofágica:** el diagnóstico diferencial debe realizarse con la pancreatitis, puesto que las dos patologías elevan la amilasa (una la salival y otra la pancreática) (Exudado).

**Absceso subfrénico:** es una zona encapsulada de gérmenes y neutrófilos que se desarrolla bajo el diafragma, posterior a una pancreatitis o a una perforación local de duodeno, colon, estómago o por divertículos (Exudado).

**Absceso intrahepático:** rara complicación de una peritonitis por migración de gérmenes vía porta al hígado (Exudado).

**Obstrucción del conducto torácico principal:** por complicación de linfomas o trauma de la columna vertebral. Este conducto nace en la Cisterna de Pecquet y vierte la linfa recogida del resto de los conductos linfáticos (excepto de los que drenan la linfa de la mitad derecha de la cabeza, tórax y cuello) en la unión de la vena subclavia con la yugular interna. La obstrucción de este conducto genera aumento de la presión en el sistema linfático (Fig. 4) produciendo un líquido pleural quiloso (turbio, amarillento), con gran cantidad de quilomicrones y triglicéridos  $> 100$  mg% (Exudado). (Fig. 17).



Figura 17. Líquido pleural quiloso (autor: Dr. Luis Palaoro)

**Eosinofilia en líquido pleural:** se considera que existe eosinofilia si los eosinófilos superan el 10% de los leucocitos en el recuento. Se relaciona el aumento de estas células a procesos inmunológicos por presencia de polvo ambiental en casos de neumotórax. Existen otras causas, como hipersensibilidad a ciertas drogas, y la existencia de cánceres como los linfomas (Fig. 18).

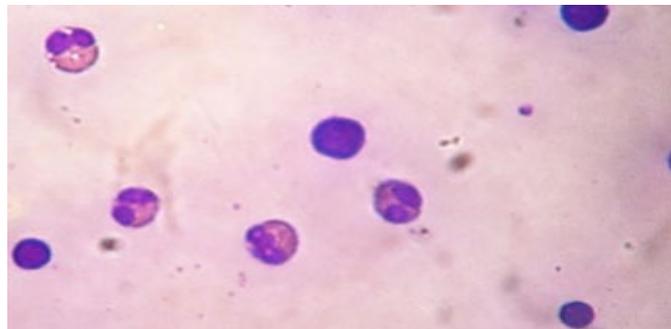


Figura 18. Eosinofilia en derrame pleural (Giemsa 40x). (autor: Dr. Luis Palaoro)

**Peritonitis bacteriana espontánea (PBE):** es la infección del líquido ascítico en ausencia de un foco infeccioso intrabdominal. Se origina por la traslocación de gérmenes desde el intestino. El recuento de neutrófilos es  $> 250/\text{mm}^3$ . El cultivo de PBE es monomicrobiano, con lo cual se lo diferencia de peritonitis, que es polimicrobiano (Exudado). (Fig. 19).

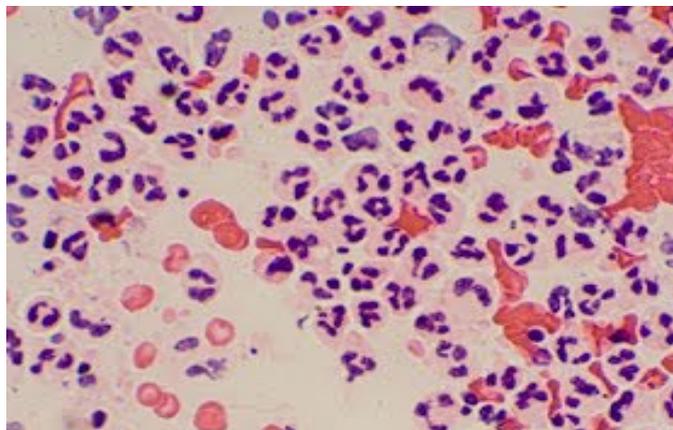


Figura 19. Neutrófilos en líquido ascítico en un caso de PBE (Papanicolaou 40x) (autor: Dr. Luis Palaoro).

**Hemotórax:** sangre en espacio pleural, por traumatismos con rotura de arteria pulmonar, tromboembolismo con infarto pulmonar y rara vez por cáncer. Los líquidos de punción son francamente hemorrágicos. El diagnóstico puede hacerse si se efectúa un **pleurocrito** (PC, es un hematocrito del líquido) y se lo compara con el **hematocrito** del paciente (HC). Si la relación **PC/HC es >0,5**, se trata de un Hemotórax. Esta técnica diferencia la presencia de sangre por la mera punción con el verdadero Hemotórax (Exudados). (Fig. 20).



Figura 20. Hemotórax: aspecto del líquido de punción pleural. (autor: Dr. Luis Palaoro).

## PARÁSITOS EN LÍQUIDOS DE PUNCIÓN

**Tripanosomas:** la presencia de estos parásitos en líquidos de punción es excepcional. Nuestro grupo pudo detectarlos en un paciente HIV positivo, procedente de Santiago del Estero (lugar endémico para Chagas), al observar la muestra en fresco (Fig. 21) (*importancia de la observación directa entre porta y cubre*). Eran tripomastigotes vivos, con sus movimientos característicos.

La coloración de Giemsa del sedimento confirmó el hallazgo (Fig. 22). El trabajo científico que publicamos es el primer informe internacional de la presencia de estas formas vivas en derrame pleural (Rocher, 2011).

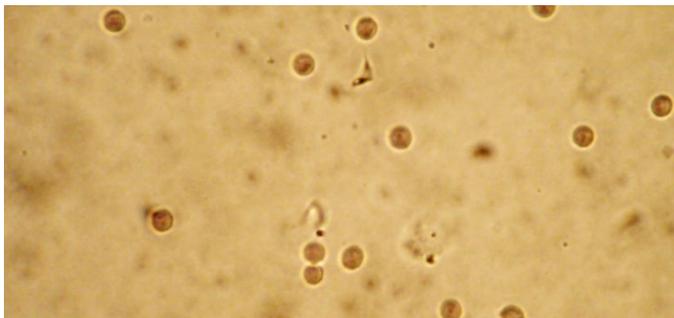


Figura 21. Tripomastigotes vivos en el líquido de punción pleural (muestra en fresco, 40x). (autor: Dr. Luis Palaoro).

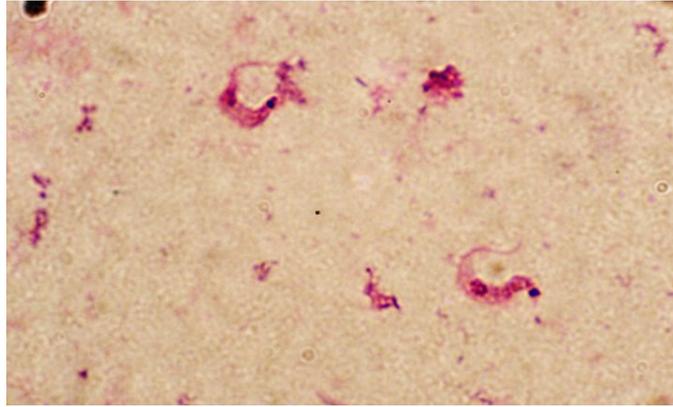


Figura 22. Tripomastigotes en el líquido de punción pleural (Giemsa 100x). (autor: Dr. Palaoro).

## DETERMINACIONES EN PATOLOGÍAS ESPECÍFICAS DE LOS LÍQUIDOS DE DERRAME

LIQUIDO PLEURAL
pH <7.3 derrame paraneumónico complicado <6.3 sospecha de rotura esofágica
Glucosa < 60 mg/dl : empiemas, neoplasias, tuberculosis y Artritis reumatoidea
Triglicéridos > 105 mg/dl: Derrame Quiloso
ADA > 40 UI/L: pleuritis tuberculosa
Amilasa LP/S >1: pancreatitis, rotura esofágica
Creatinina LP/S >1: Urinotorax

LIQUIDO ASCITICO
Glucosa baja en peritonitis tuberculosa, carcinomatosis y PBE
Amilasa > 2000 U/L: Ascitis pancreática, perforación intestinal
Urea y Creatinina: elevadas en rotura de vejiga
Trigliceridos > al VR en sangre: Quiloperitoneo
ADA $\geq$ 39 U/L: tuberculosis peritoneal

## INTRODUCCIÓN A LAS PATOLOGÍAS MALIGNAS EN LÍQUIDOS DE PUNCIÓN

Los tumores de las serosas pueden ser primarios o metastásicos. Los primarios se denominan **mesoteliomas**, que se presenta en dos formas: benigno, no diagnosticable por citología, y maligno, de origen exclusivamente pleural y que presenta abundante exfoliación.

### TUMORES PRIMARIOS DE SEROSAS

- **Mesotelioma maligno**, se desarrolla en personas que tuvieron exposición frecuente al asbesto. Es un tumor de baja frecuencia, aunque hace años se registró un marcado incremento, en especial en USA, probablemente por asociación con el virus SV 40, contaminante de las vacunas utilizadas en forma masiva para prevenir la poliomielitis y las infecciones por adenovirus. El SV 40 es considerado oncogénico en animales, pero se está investigando si la interacción de su proteína T large con las proteínas de genes supresores p53 y pRb pueden colaborar en el desarrollo de mesoteliomas en humanos, asociado a fibras de asbestos, un factor etiológico de larga data (Fig. 23).

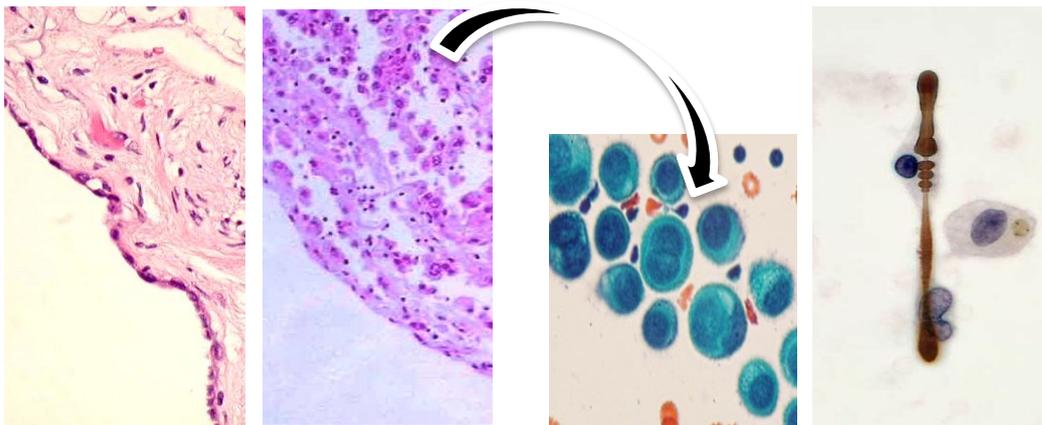


Figura 23. Mesotelioma maligno: de izquierda a derecha: Mesotelio normal, Mesotelioma maligno en pleura, células neoplásicas exfoliadas a la cavidad pleural, fibra de asbesto (H&E, Papanicolaou, 40x y 100x). (autor: Dr. Luis Palaoro).

Las células malignas primitivas de pleura observadas en derrames presentan un amplio espectro morfológico, que varía desde una imagen de célula reactiva hasta la presencia de grandes núcleos hiper cromáticos e irregulares. Pueden exfoliar libres o agrupadas; en muchos casos la relación N/C se mantiene dentro de los límites normales, aunque es frecuente la multinucleación y la presencia de nucléolos marcados.

El citodiagnóstico de mesoteliomas malignos es difícil, y en la mayoría de los casos se requiere de datos aportados por la historia clínica y por determinaciones complementarias (ver inmunomarcación) (Fig. 24).

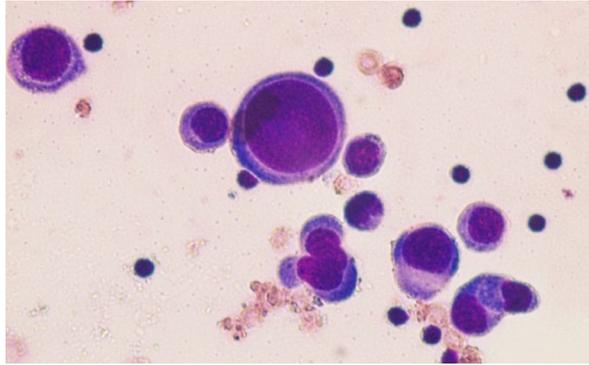


Figura 24. Células exfoliadas de un mesotelioma maligno en un derrame pleural (Giemsa 40x). . (autor: Dr. Luis Palaoro).

NOTA: los mesoteliomas liberan grandes cantidades de ácido hialurónico, que confieren alta viscosidad al líquido pleural. Es un criterio secundario importante para sospechar la presencia de este tumor.

#### **TUMORES METASTÁSICOS DE SEROSAS** (Fig. 25)

Casi la totalidad de los tumores metastásicos son **adenocarcinomas**; los **tumores de origen mesenquimático** constituyen un pequeño porcentaje y los **carcinomas pavimentosos** son prácticamente inexistentes.

Las células exfoliadas de un adenocarcinoma presentan características que permiten incluirlas correctamente en esta estirpe: núcleos con cromatina irregular, grandes nucléolos, vacuolización citoplasmática, tendencia a la formación de grupos tridimensionales (Fig. 26). La citología debería reconocer la presencia de este tipo de neoplasia, aunque en ocasiones puede sospecharse incluso el origen del tumor primitivo, teniendo en cuenta ciertas imágenes peculiares conjuntamente con los datos clínicos del paciente. Así, las ascitis en mujeres son producidas predominantemente por carcinomas de ovario; el *cistoadenocarcinoma seroso del ovario* puede desarrollar imágenes de pseudociliación que se reconocen fácilmente con coloración de Giemsa (importancia de la doble coloración). Las metástasis peritoneales de *carcinomas gástricos y de colon* suelen mostrar grandes células aisladas, con o sin vacuolas y alta relación N/C con gran nucléolo. El carcinoma lobulillar de mama exfolia células pequeñas, hipercromáticas y moldeadas, que pueden confundirse no obstante con el "oat cell" pulmonar (tumores neuroendocrinos de células pequeñas). Una población monótona de células con alta relación N/C, núcleos irregulares y cromatina grosera es sospechosa para metástasis de linfoma; en este caso, como en los tumores mesenquimáticos, la coloración de Giemsa es la indicada.

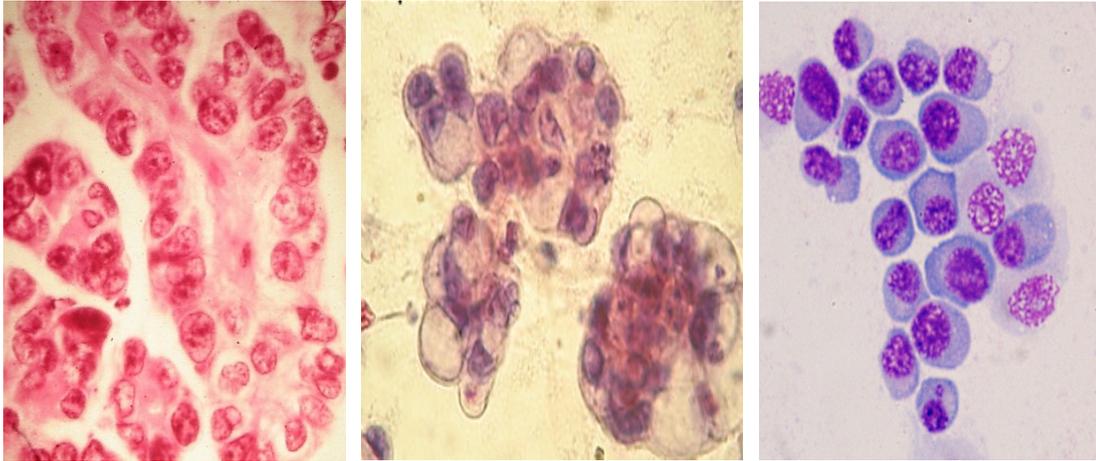


Figura 25. Tumores metastásicos en serosas. De izquierda a derecha: Biopsia de la metástasis de un adenocarcinoma a una membrana serosa, células adenocarcinomas exfoliadas a la cavidad serosa, células de un plasmocitoma en una cavidad serosa (H&E, Papanicolaou y Giemsa, 40x). (autor: Dr. Luis Palaoro).



Figura 26. Células provenientes de una metástasis de adenocarcinoma a serosa (Papanicolaou 40x). (autor: Dr. Luis Palaoro).

El Bioquímico no especialista, cuando recibe un líquido de punción en un laboratorio de guardia, tiene la oportunidad de dar la alarma de la presencia de células no habituales (“otras células”, como se explicó anteriormente). Aunque no pueda identificarlas, el sólo hecho de informar su presencia es un paso fundamental en el citodiagnóstico de las patologías neoplásicas (Fig 27). Por ese motivo es que se conservan extendidos en alcohol (ver etapa analítica) para realizar posteriormente coloraciones específicas (Papanicolaou) o marcadores oncológicos.

No obstante, el bioquímico de guardia puede sospechar la presencia de adenocarcinomas con la coloración de Giemsa, que realiza rutinariamente (Fig. 27).

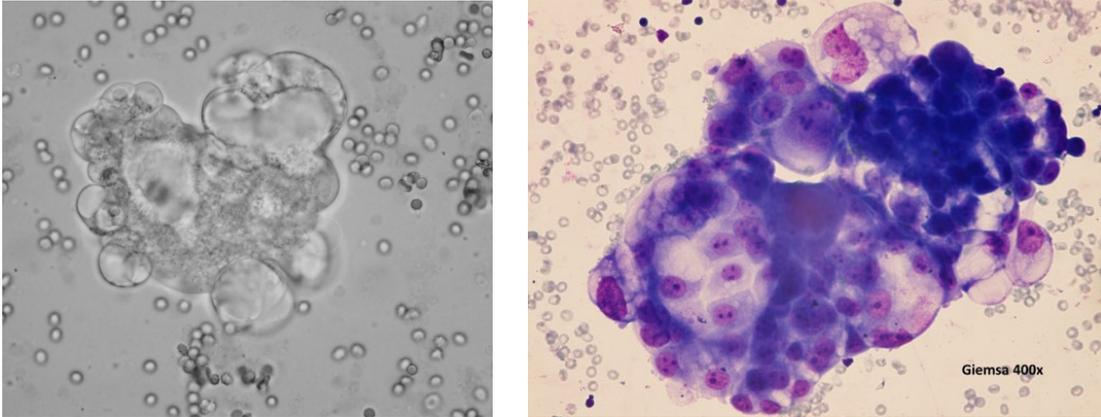


Figura 27. Izquierda: Adenocarcinoma en un líquido de punción, en fresco. Derecha: adenocarcinoma en un líquido de punción, coloreado con Giemsa (40x). (autor: Dr. Luis Palaoro).

NOTA: es importante tener en cuenta que la mayoría de los diagnósticos primarios de neoplasias en serosas se hacen a partir de la observación microscópica directa de los líquidos de derrame!

### TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS EN LÍQUIDOS DE PUNCIÓN

Diversos métodos se utilizan a fin de mejorar el citodiagnóstico de las efusiones, porque la morfología celular, con los métodos convencionales, no permite establecer con seguridad el carácter benigno o maligno de las células. Se recurre, entonces, a métodos citoquímicos, estudio de ploidía, inmunomarcación o técnica de AgNOR, entre otros.

### ESTUDIO DE PLOIDÍA

Este método se basa en que las poblaciones de células mesoteliales normales son euploides, mientras que las células adenocarcinomatosas son aneuploides en la mayoría de los casos. Las **células mesoteliales reactivas** a veces presentan anomalías marcadas, imposibilitando el diagnóstico seguro de benignidad, si se las estudia con las coloraciones morfológicas solamente (Giemsa o Papanicolaou). Se ejecuta sobre los extendidos una coloración de Feulgen, y se observa el preparado en un microscopio conectado a una computadora que tenga un programa para analizar imágenes. En el monitor se marcan los núcleos (alrededor de 200) para establecer la ploidía (contenido de ADN) de cada núcleo, y se construye un histograma, representando la frecuencia de las células en función de su contenido de ADN. Si el pico del histograma corresponde al contenido 2N (euploide), las células sospechosas son benignas, pero si el pico se ubica en otro lugar (distinto de un múltiplo par de 2N), la población es aneuploide y por lo tanto se trata de células malignas (Fig. 28).

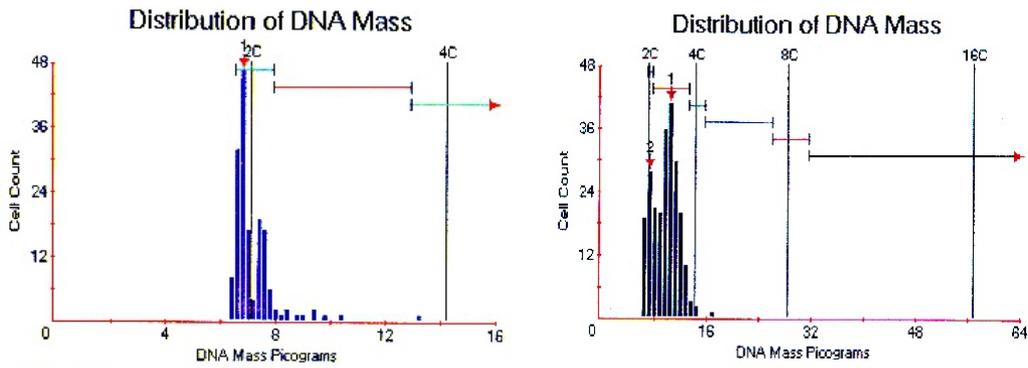
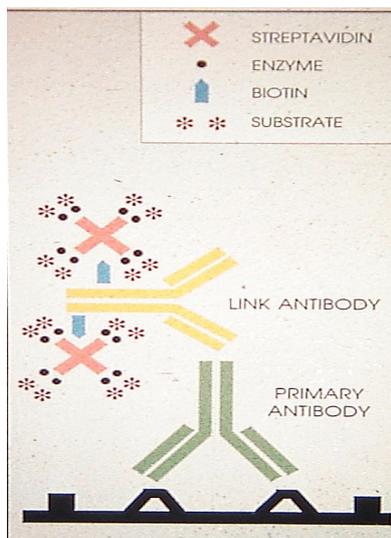


Figura 28. Ploidía en líquidos de punción. Izquierda: histograma de una población euploide, con pico en 2C (2N). Derecha: población aneuploide, con pico en 3C (3N).

### INMUNOMARCACIÓN

Esta técnica detecta la presencia de marcadores oncológicos en las células del líquido utilizando anticuerpos, a fin de establecer su carácter benigno o maligno. Por lo tanto, siempre se practica en el caso de que las células sospechosas no puedan ser definidas con los métodos habituales. Se utiliza un *set* de anticuerpos, nunca uno sólo, para conseguir la mejor combinación de sensibilidad y especificidad. Nuestro grupo utiliza tres anticuerpos contra: antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno epitelial de membrana (EMA) y BerEP4 (marcador de adenocarcinomas).

El método básico es el de Sternberger (P.A.P. ó Peroxidasa-Antiperoxidasa), pero hoy en día se utilizan variantes, como S-ABC (Streptoavidina-Biotina Complejo). Luego de incubar las muestras con los anticuerpos, se revela la presencia de Peroxidasa por medio de DAB (Diaminobencidina) y Peróxido de Hidrógeno. Las coloraciones pardas en las células indican la presencia del marcador en estudio (Fig. 29 y 30).



	Cél Reactivas	Adenocarcinoma
<b>CEA</b>	- / ±	+++
<b>EMA</b>	-	++
<b>Ber-EP 4</b>	-	++

Diferencias entre la expresión de tres marcadores oncológicos en células reactivas (benignas) y neoplásicas (adenocarcinomas). Observar que CEA es el más sensible, pero el menos específico.

Figura 29. Método S-ABC para inmunomarcación.

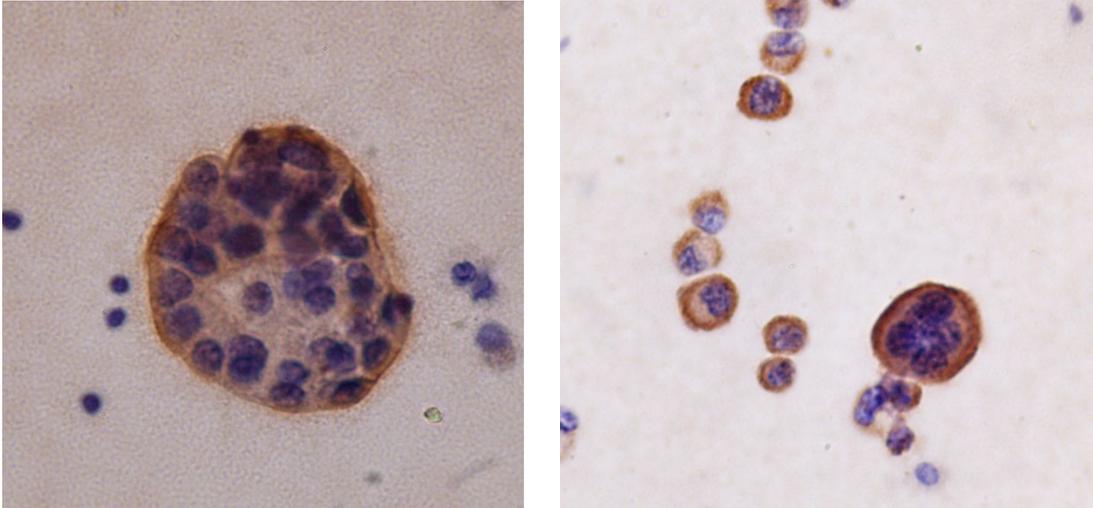


Figura 30. Inmunomarcación para EMA (Izquierda) y CEA (derecha) en células exfoliadas en un derrame pleural originado por metástasis de un carcinoma de mama a pleura (Inmunomarcación 60 y 40x). (autor: Dr. Luis Palaoro).

**TÉCNICA DE AgNOR:** detecta por medio del uso de sales de plata, las proteínas fibrilares no histonas ubicadas en las regiones del ADN organizadoras del nucléolo (NOR). Por eso la técnica se denomina AgNOR: Ag (símbolo de Plata) y NOR: regiones organizadoras del nucléolo. El número y tamaño de los NOR refleja la actividad, proliferación o transformación de las células. El aumento de su número o de su tamaño se relaciona con la transformación celular, vale decir, con el carácter maligno de las células (Fig. 31).

Pasos de la técnica: se fijan las muestras en etanol 96° y se cubren con una solución formada por: 2 partes de Nitrato de Plata 50% P/V y 1 parte de gelatina 1% P/V en ácido fórmico 1% P/V (25 min en oscuridad). Se lavan tres veces con agua desionizada y se tratan con una solución de Tiosulfato al 1% P/V. Se lavan con agua, se deshidratan con xileno y se montan con Bálsamo de Canadá. Se cuentan los puntos utilizando objetivo de inmersión.

Para **diferenciar células reactivas de células adenocarcinomas en líquidos de punción**, se cuentan los puntos NOR en 100 células y se promedian; si los promedios son inferiores a 6,4 son células benignas, y si superan a 10, son células neoplásicas. Estos valores fueron establecidos por nuestro grupo (cada laboratorio puede confirmar o ajustar estas cifras a su propia experiencia).

Los promedios obtenidos para los dos tipos celulares no se superponen (Ver Tabla a continuación):

Células mesoteliales reactivas (n=16)		Células neoplásicas (n=15)	
Muestra	puntos/célula	Muestra	puntos/célula
n	x	n	x
1	5,40	17	14,00
2	4,00	18	12,80
3	4,40	19	12,00
4	4,20	20	15,30
5	3,02	21	9,54
6	2,27	22	14,74
7	2,90	23	10,00
8	3,41	24	10,45
9	5,22	25	12,60
10	5,20	26	20,11
11	5,41	27	15,10
12	4,70	28	10,10
13	7,23	29	10,00
14	6,16	30	17,50
15	6,45	31	22,50
16	7,12		
media	4,88		13,78
mediana	5,21		12,80
DE	1,50		3,89

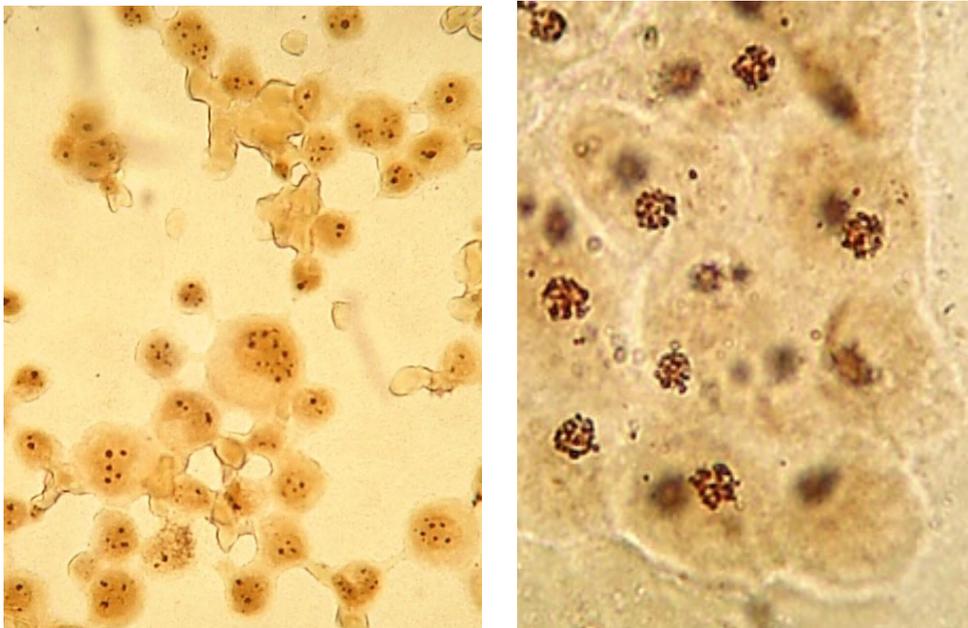


Figura 31. AgNOR en líquidos de punción. Izquierda: células reactivas – Derecha: células neoplásicas (40 y 100x). La ventaja de la técnica de AgNOR sobre la inmunomarcación es su bajo costo (autor: Dr. Luis Palaoro).

### MECANISMOS DE DISEMINACIÓN DE TUMORES A MEMBRANA SEROSAS

Cuando un tumor maligno primitivo se disemina, primero debe invadir los tejidos circundantes. En el caso de los CARCINOMAS, las células neoplásicas deben destruir la membrana basal, lo que implica cambios en el citoesqueleto: a este fenómeno se denomina **Transición Epitelio-Mesénquima (EMT)**. Las células pierden sus características epiteliales

(reemplazan su duro esqueleto de citoqueratina por el de vimentina, lo que les permite deformarse y adquirir movilidad como las células del mesénquima). Avanzan por el estroma hasta endotelio, se produce intravasación y luego de recorrer las vías sanguíneas o linfáticas extravasan al sitio de siembra (metástasis). Cuando alcanzan el sitio de siembra a distancia, recuperan sus características epiteliales; a este proceso inverso se lo denomina **MET (Transición Mesénquima-Epitelio)** (Fig 32).

En el caso de las diseminaciones a serosas, muchos tumores lo hacen directamente, por la proximidad de las membranas. A este proceso, donde no se utilizan las vías hematógenas, se lo denomina **diseminación transcelómica**.

Los cánceres de pulmón se diseminan a pleura casi siempre por vía transcelómica. En la cavidad peritoneal, en especial los tumores de tipo mucinoso se diseminan directamente, como ocurre en los carcinomas gástricos, pancreáticos, de vesícula biliar, hepáticos y ováricos.

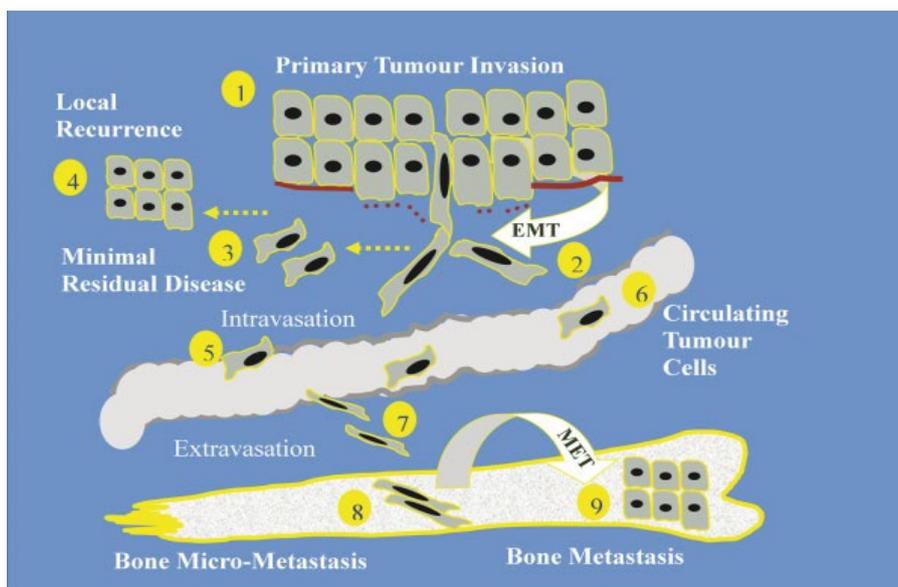


Figura 32. EMT y MET. Tomado de Hugo H et al: Epithelial - Mesenchymal and Mesenchymal-Epithelial Transitions in Carcinoma Progression. J Cell Physiol 2007; 213: 374–383.

Estos últimos se ven favorecidos por la discontinuidad de la membrana peritoneal que rodea al ovario, lo que permite la salida de las células neoplásicas directamente a la cavidad (Fig. 33 y 34).

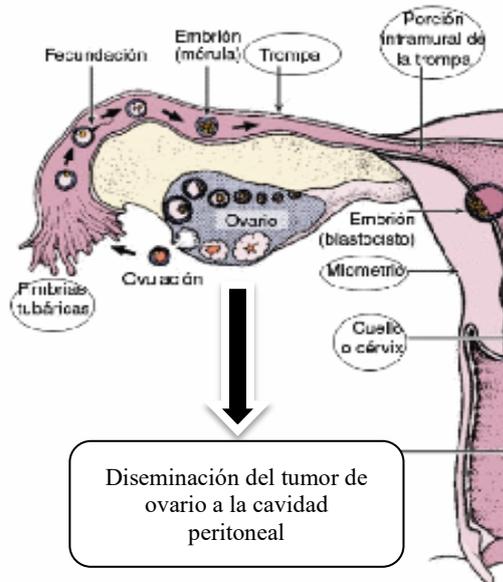


Figura 33. Las células neoplásicas viajan por la ascitis hasta sitios de implante en peritoneo (en especial el omentum). Durante su traslado se producen fenómenos EMT y MET parciales. A continuación, se describirán los cambios que ocurren desde la salida del tumor hasta su anidamiento en peritoneo, en una diseminación transcelómica.

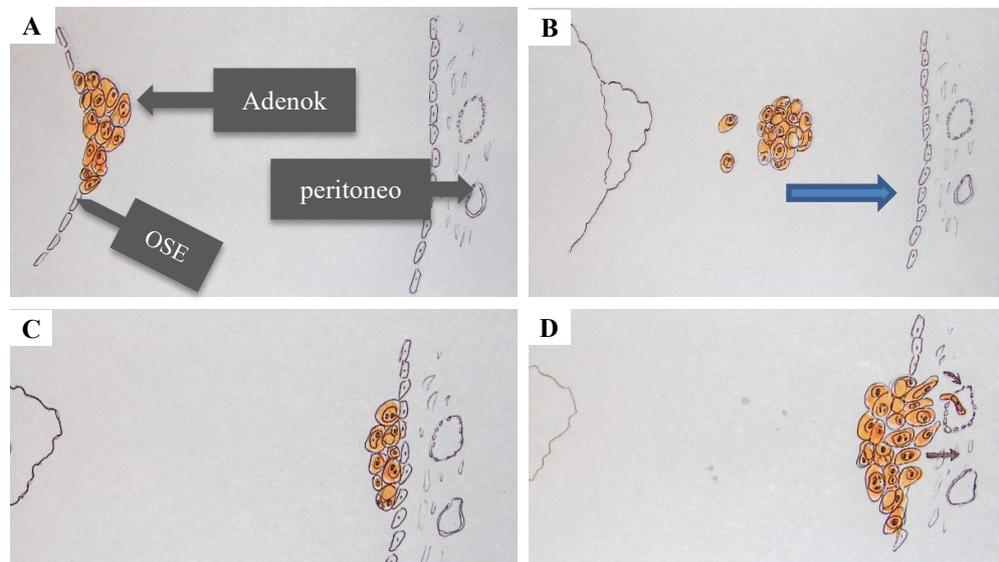


Figura 34. Diseminación transcelómica de un cáncer de ovario a peritoneo. A: MET; el epitelio superficial del ovario (OSE), que tiene características mesenquimáticas, se maligniza a adenocarcinoma – B: EMT; Las células neoplásicas se mueven por la ascitis hacia el peritoneo – C: MET; las células neoplásicas se anidan en el peritoneo – D: EMT; comienzan a invadir al estroma subyacente, y más tarde entran en los capilares. (autor: Dr. Luis Palaoro).

### MECANISMOS MOLECULARES EN LA DISEMINACIÓN DE LÍQUIDOS DE PUNCIÓN

Hoy en día se considera que la evolución de los cánceres depende no sólo de las alteraciones de las células neoplásicas, sino de las relaciones con el entorno. Estas relaciones se logran por activación de numerosos receptores por interleuquinas secretadas tanto por el tumor como por las células del estroma. El caso más estudiado es el de la diseminación del cáncer de ovario a peritoneo. Las transiciones EMT y MET están reguladas

por una compleja red de mecanismos moleculares, sólo se citarán alguno de éstos. En el sitio del tumor (ovario), los fibroblastos del estroma que rodean a las células tumorales (CAF: fibroblastos asociados al cáncer) son estimulados por las células neoplásicas que secretan el factor de crecimiento tumoral  $\beta$  para que liberen unos proteoglicanos denominados VCAN, que activan la expresión de un receptor en las células tumorales denominado CD44, que es fundamental para el posterior anidamiento de las células al peritoneo. También el VCAN interviene en el comienzo de EMT. Las células del tumor también liberan el factor de crecimiento fibroblástico que se une a receptores del endotelio para desencadenar angiogénesis.

Una vez que el tumor alcanza al peritoneo (en especial al Omentum), los macrófagos del lugar lo activan por medio de la secreción del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), al tiempo que secretan factor de crecimiento endotelial (VEGF) para estimular la angiogénesis. Los adipocitos del Omentum también liberan TNF $\alpha$  e interleuquinas inflamatorias que favorecen la diseminación del tumor.

Queda un punto importante, ¿cómo se anidan las células neoplásicas al peritoneo?: por medio del receptor CD44, que junto a la  $\beta$  Integrina 12 se unen al ácido hialurónico de las células mesoteliales. Esto explica porqué ciertos cánceres no pueden anidar en serosas, al carecer de CD44 y de la integrina mencionada. Todos los adenocarcinomas, así como muchos tumores mesenquimáticos (linfomas, leucemias, plasmocitomas) pueden diseminarse a serosas por poseer dichas moléculas.

## LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR)

### Nociones sobre su origen y distribución

El LCR llena los ventrículos cerebrales, el conducto medular y el espacio subaracnoideo. Los agujeros de Monro conectan los ventrículos laterales con el 3° ventrículo. Este se conecta con el 4° por el acueducto de Silvio. El 4° ventrículo tiene tres agujeros: dos de Luschka y uno de Magendie que lo conectan con el espacio subaracnoideo (espacio que se encuentra entre la aracnoides y la piamadre; esta última está pegada al cerebro). Además, a través del canal medular se conecta con el interior de la médula espinal (ME). En resumen, el líquido, cuando sale del 4° ventrículo, circula alrededor de la ME y el encéfalo. Todos los ventrículos y la ME están tapizados por una membrana denominada epéndimo, cuyas células contienen microvellosidades que facilitan el movimiento del líquido y el intercambio de nutrientes. El LCR se origina en los plexos coroideos, ubicados en la pared medial de los ventrículos laterales y en el techo del 3° y 4° ventrículo. Los plexos coroideos, formados a partir de la piamadre, están formados por células endimarias que rodean las arterias cuyo

filtrado (LCR) se vierte a los espacios ocupados por el líquido, que luego es eliminado hacia los senos venosos de la duramadre (que está pegada al hueso del cráneo) por las vellosidades aracnoideas (dichos senos están entre las dos hojas que forman la duramadre). Estas vellosidades aracnoideas son evaginaciones del espacio subaracnoideo que se proyectan a los senos venosos de la duramadre. Desde allí se vierte en la vena yugular interna a la circulación general (Fig. 35 y 36).

El volumen de LCR en el adulto es alrededor de 100-150 mL y en recién nacidos oscila entre 10 a 60 mL (se renueva 4 a 5 veces/día). Existe un transporte activo entre la sangre, LCR y cerebro, lo que da lugar a una composición química distinta a un ultrafiltrado plasmático. Los electrolitos como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Cl}^-$  y lactato están más concentrados en el LCR que en el plasma, mientras que el bicarbonato, glucosa y urea se hallan en menor proporción. Las proteínas solo pasan al LCR en cantidades muy pequeñas.

El LCR baña el encéfalo y la médula espinal y tiene las siguientes funciones:

- Amortiguar y nutrir al SNC.
- Brindar estabilidad mecánica del encéfalo. Mantener la presión interna.
- Controlar el entorno químico del SNC: pH, iones, proteínas, glúcidos, etc.
- Realizar el transporte de algunas hormonas y neurotransmisores.
- Eliminar metabolitos (deshechos) del SNC.

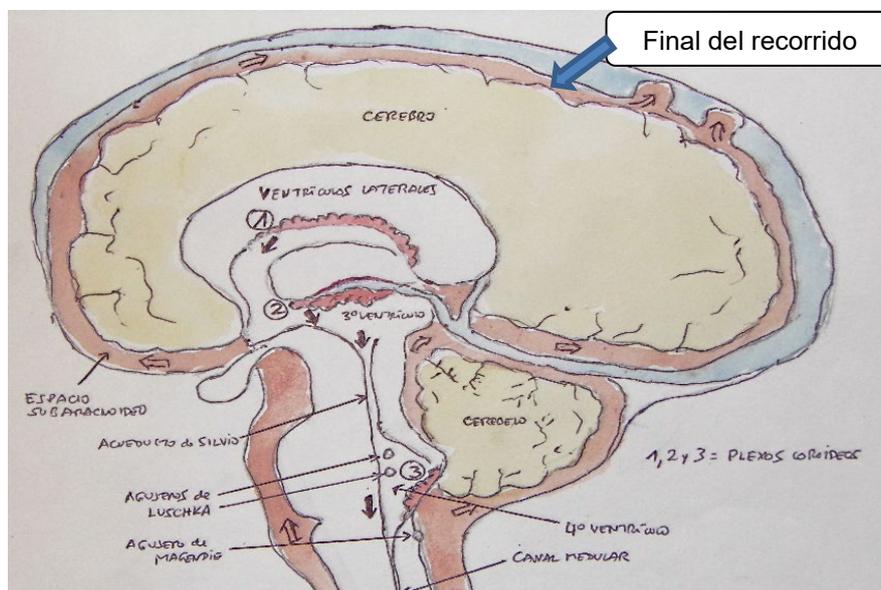


Figura 35. Origen y eliminación del LCR. Las flechas negras indican la ruta descendente desde los plexos coroideos (1,2,3). Las flecha claras su camino hacia los senos venosos para su eliminación. (autor: Dr. Luis Palaoro).

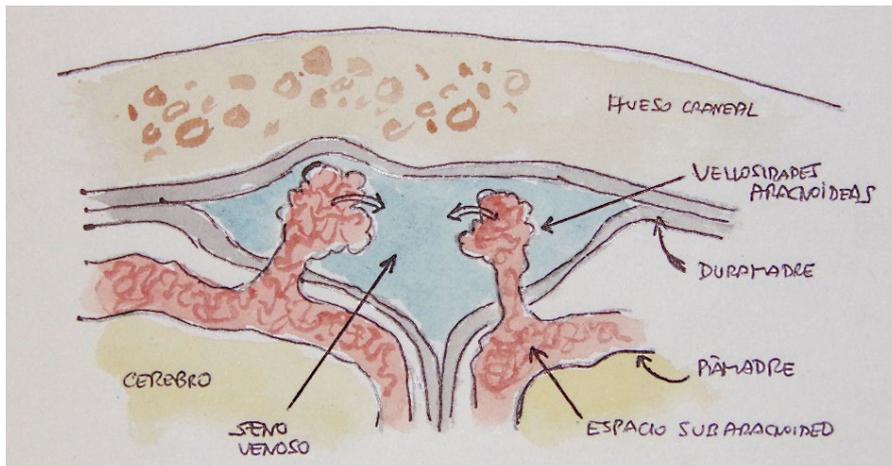


Figura 36. Detalle del final del recorrido del LCR. Desde las vellosidades aracnoideas se elimina al seno venoso. (autor: Dr. Luis Palaoro).

Numerosas enfermedades que alteran la barrera hematoencefálica cambian la composición del LCR, por ello es importante su estudio ya que su análisis resulta determinante en el diagnóstico de enfermedades infecciosas (meningitis y encefalitis), autoinmunes, cáncer, hemorragia subaracnoidea y trastornos desmielinizantes.

## ETAPA PREANALÍTICA

### Toma de muestra

La técnica de extracción de LCR para su posterior análisis es la punción lumbar, siendo un procedimiento estrictamente médico. Para ello, el paciente puede permanecer acostado o sentado, se limpia el sitio de punción, se aplica un anestésico local y se utiliza una aguja de aproximadamente 10 cm con mandril que se introduce en el espacio intervertebral L3 y L4 (en niños L4 y L5) (Fig. 37). Con la aguja apoyada en la duramadre, se mide la presión del LCR con un manómetro graduado adherido a la jeringa (presión del LCR en adultos: 90-180 mmHg y en niños: 10-100 mmHg), de manera que comience a gotear este líquido.

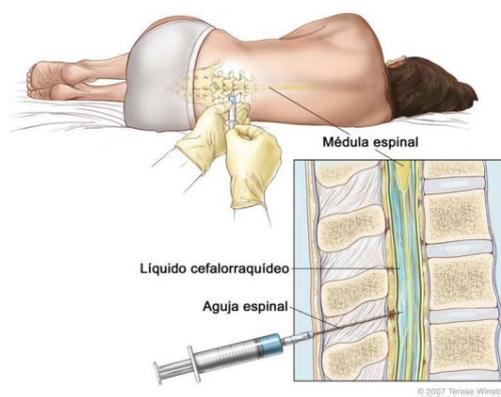


Figura 37. Colocación de la aguja para la recolección de LCR.

En general se recolectan lentamente entre 10-20 mL de LCR que se distribuye en tubos estériles numerados en forma secuencial. Al final del procedimiento de obtención del LCR, se retira la aguja, se limpia el área y se aplica un vendaje sobre el sitio de punción. La indicación básica de punción lumbar en pediatría es el diagnóstico de una infección meníngea. La contraindicación más importante y absoluta para la ejecución de la punción lumbar es la presencia de hipertensión intracraneal.

Los análisis a efectuar en cada tubo dependen del protocolo del laboratorio o de la solicitud del médico. ¡No usar ningún anticoagulante en su obtención!.

El LCR se debería recoger en 3 tubos estériles (a veces no es posible por el escaso volumen obtenido), para la realización de exámenes físico-químicos y serológicos, microbiológicos y recuento de células y un tubo adicional si se requiere de estudios moleculares. Los tubos deben ser de plástico (polipropileno) para evitar adherencias de las células al vidrio del tubo. Los exámenes físico-químicos y citológicos se deben efectuar **antes de las 2h de su obtención!**, el líquido se conserva, mientras tanto, a temperatura ambiente. Los cultivos se deben realizar antes de 24h, con el líquido a temperatura ambiente. El examen de ADA puede postergarse no más de 48h, guardando el LCR en heladera. ¡Recordar que se debe obtener una muestra de sangre!.

### Exámen Macroscópico

Consiste en observar el color y la turbidez. El LCR normal es incoloro y transparente (cristal de roca), con mínima cantidad de sustancias y de células. Cuando el LCR es patológico su aspecto puede variar a turbio u opalescente, o xantocrómico o con coágulos.

- La **turbidez u opalescencia** puede ser a causa de la presencia de células (leucocitos, eritrocitos), microorganismos (bacterias, hongos, etc) o proteínas.
- La **xantocromía**: coloración amarillo-anaranjado o directamente coloración rojiza que implica la posibilidad de una hemorragia subdural. La mayoría de las veces es causada por la lisis de hematíes que resulta en la degradación de la hemoglobina a oxihemoglobina, metahemoglobina y bilirrubina. La xantocromía está presente en más de 90% de los pacientes dentro de las 12h posteriores al inicio de una hemorragia subaracnoidea y en pacientes con niveles séricos de bilirrubina entre 10-15mg/dL.

La xantocromía en recién nacidos prematuros sanos, puede producirse como consecuencia de los efectos combinados de la inmadurez de la barrera hematoencefálica y las concentraciones fisiológicamente elevadas de bilirrubina y proteínas en sangre.

Si el LCR es xantocrómico, se sugiere reportar el color después de centrifugar, con presencia o ausencia de botón hemático, ya que permite diferenciar procesos hemorrágicos intracraneales de hemorragia accidental o traumática. En este último caso el líquido se va aclarando a medida que progresa la punción.

## ETAPA ANALÍTICA

### Examen Químico

#### - Glucosa

La glucosa penetra en el LCR desde el plasma por difusión pasiva y transporte activo. Los niveles de glucosa en el LCR en los adultos sanos es alrededor del 60-70% de la concentración sérica. Debido a esta estrecha correlación del analito, es conveniente medir ambas concentraciones simultáneamente.

Valor de Referencia: Glucorraquia (VR: 50-85 mg/dL). La elevación de glucosa en el LCR (hiperglucorraquia) suele estar relacionada con altos niveles de glucosa sérica (p. ej., diabetes tipo 2). La disminución de la concentración de glucosa en el LCR puede ser consecuencia a una deficiencia en el mecanismo de transporte activo, una mayor utilización de la glucosa por el SNC, tejidos, microorganismos o por una hipoglucemia prolongada. El hallazgo de bajos niveles de glucosa en LCR, acompañado de un incremento en el recuento de leucocitos y un alto porcentaje de neutrófilos, son indicativos de meningitis bacteriana.

#### Proteínas

El estudio proteico del LCR constituye una fuente importante de información en distintos cuadros neurológicos. En condiciones normales, la concentración de proteínas en plasma es 200 veces superior a la del LCR. Las principales proteínas presentes en el LCR son la albúmina (alrededor de 15,5 mg/dL), prealbúmina (1,7 mg/dL), transferrina (1,4 mg/dL), inmunoglobulina G (1,2 mg/dL), inmunoglobulina A (0,13 mg/dL) y ceruloplasmina (0,1 mg/dL).

**Proteinorraquia:** la concentración de proteínas en el LCR varía ligeramente con la edad, aunque durante el período neonatal la concentración es mayor (30-140 mg/dL), en el adulto descende su concentración hasta 15-45 mg/dL.

La proteinorraquia: aumenta en hemorragia cerebral, alteración de la barrera hematoencefálica (meningitis, tumores), enfermedades desmielinizantes (esclerosis múltiple).

#### Cloro

La concentración de cloro en el LCR es mayor que en el plasma, este contiene alrededor de 120-127 mmol/L; en todos los tipos de meningitis agudas, la cifra de cloro disminuye, acentuándose este descenso casi en forma constante en la meningitis tuberculosa. Para algunos, valores de cloro menores de 80 mmol/L, se consideran patognomónicos de tuberculosis cerebral.

## Lactato

Su valor se eleva en meningitis bacterianas debido a una disminución de la irrigación cerebral, seguida de hipoxia, catabolismo anaeróbico con formación de ácido láctico. Su concentración en LCR depende de su tasa de producción en el cerebro y es independiente del lactato sérico. Es un indicador útil del metabolismo cerebral.

Valor de referencia: 9 – 26 mg%.

## LDH

La enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) se encuentra distribuida en casi todos los tejidos del organismo. En el cerebro, LDH puede aumentar su concentración en alteraciones del SNC. Las concentraciones catalíticas elevadas de LDH ayudan en el diagnóstico diferencial de las meningitis bacterianas y víricas, ya que en el 90% de las meningitis bacterianas incrementa la concentración de esta enzima.

Valor de referencia de LDH en el LCR: 5-25 UI/L.

Importancia clínica del aspecto del LCR

Aspecto	Causa	Principal significado
Claro, cristalino		Normal
Opalescente, turbio, lechoso	Leucocitos y/o microorganismos Proteínas	Meningitis Trastornos barrera hematoencefálica Producción de IgG dentro del SNC
Sanguinolento	Eritrocitos	Hemorragia subaracnoidea Punción traumática
Xantocrómico (rosa, anaranjado o amarillo)	Hemoglobina	Hemorragia antigua Células destruidas por punción traumática
	Bilirrubina	Degradación de eritrocitos Concentración elevada de bilirrubina sérica
	Proteínas (> 1,5 g/L)	Trastornos barrera hematoencefálica
	Melanina	Melanosarcoma meningeo
Coagulado	Proteínas Factores de coagulación	Trastornos barrera hematoencefálica Introducidos por la punción traumática
Con película (membrana)	Proteínas Factores de la coagulación	Trastornos barrera hematoencefálica Meningitis tuberculosa

## EXAMEN CITOLÓGICO

Se coloca una gota de LCR entre porta y cubre y se observa en fresco los elementos formes: hematíes, células leucocitarias, otras células, parásitos, etc. Si la muestra es muy escasa, realizar este informe luego de cargar la cámara de Neubauer para el recuento (se describió en líquidos de derrame). Por lo general, no es necesario hacer ninguna dilución. Valores de referencia del recuento: de 0 a 30 células (casi todas linfocitos)/mm<sup>3</sup>.

**Recuento diferencial:** Se centrifuga el LCR utilizando un **citocentrífuga** (no se admite otro tipo de centrifugación) pues el bajo número de células produciría grandes errores de diagnóstico (los niños con leucemias agudas son controlados por medio del estudio de LCR para investigar si el cáncer se propagó al SNC. En la mayoría de los casos sólo se observan unos pocos blastos; sin la citocentrífuga su observación sería imposible) (Fig. 38).



Figura 38. Izquierda: Citocentrífuga cargada con varias muestras. Derecha: set de elementos que se utilizan en cada muestra. La flecha señala el potaobjeto con la zona de sediment concentrada.

La citocentrífuga concentra el material en una pequeña zona del portaobjeto, que debe fijarse con metanol y luego teñirse con **Giemsa diluido** como para las fórmulas sanguíneas, pero utilizando 1/3 del tiempo de coloración.

VR: Linfocitos: 80-90%, Monocitos: 10-20% (Fig. 39).

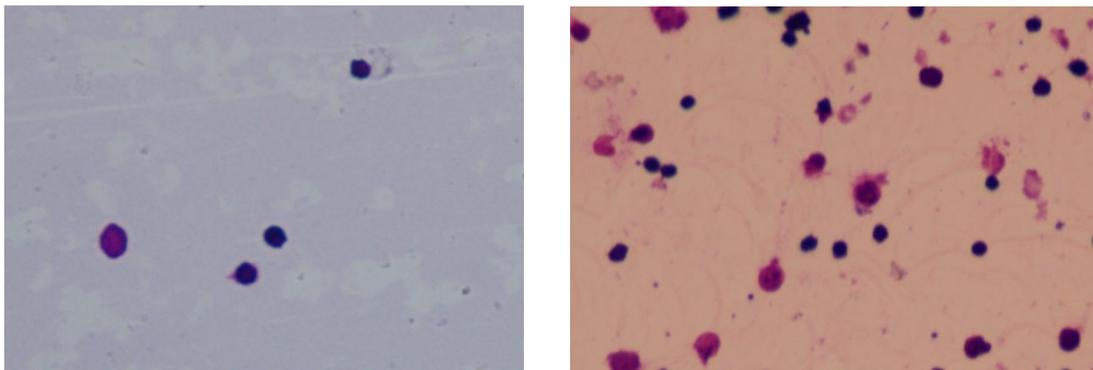


Figura 39. Sedimentos de LCR normal (izquierda) y con gran número de linfocitos y algunas células necróticas (derecha) (Citocentrífuga y Giemsa,40x). (autor: Dr. Luis Palaoro).

### CITOLOGÍAS DE LCR EN DIVERSAS PATOLOGÍAS

Las meningitis se diferencian en los porcentajes celulares. Una meningitis bacteriana cursa con pleocitosis con neto predominio de neutrófilos, mientras que en las meningitis de causa viral el predominio es linfocitario (Fig. 40).

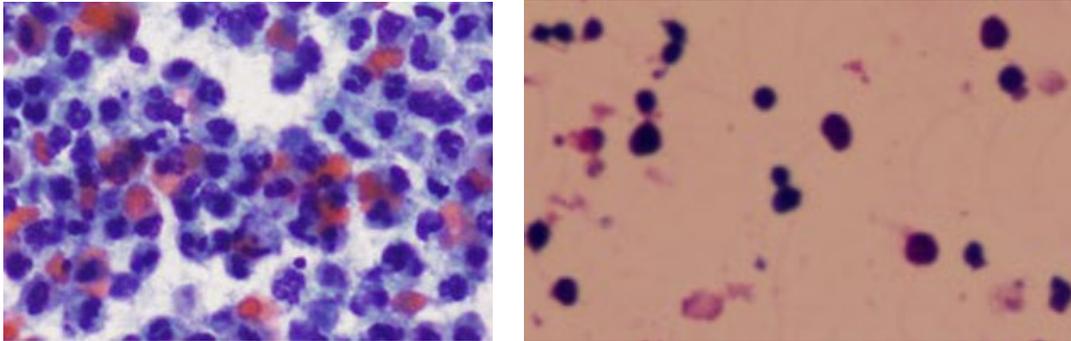


Figura 40. LCR en meningitis bacteriana (izquierda) y viral (derecha) (Giemsa 60x). (autor: Dr. Luis Palaoro).

La presencia de *Criptococos* puede ser observada en fresco, pero se confirma con coloraciones (Giemsa, Papanicolaou) y con el método de tinta china (Fig. 41).

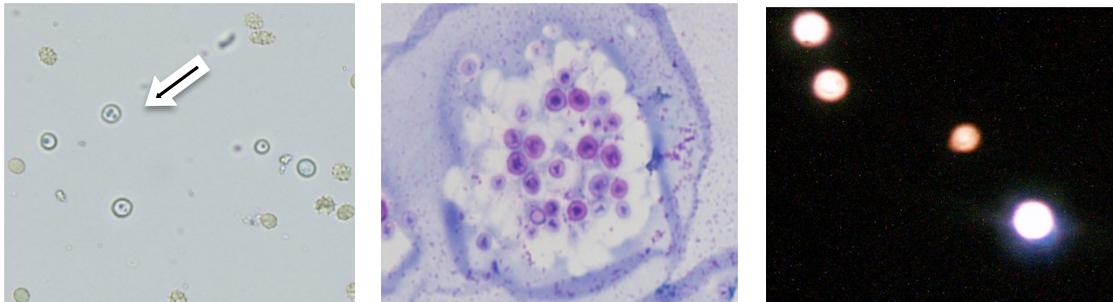


Figura 41. *Criptococos* en LCR: De izquierda a derecha: fresco, Giemsa y tinta china (40, 40 y 60x). (autor: Dr. Luis Palaoro).

Pueden aparecer células provenientes de **tumores**, primarios del SNC o metastásicos (leucemia linfoblástica aguda, especialmente, y linfomas). Su diagnóstico, en la mayoría de los casos, requiere de un profesional especializado, pero tal como ocurre en líquidos de derrame, la observación de células -no habituales- puede dar la voz de alarma. Conviene en estos casos conservar extendidos fijados por sequedad (pues la coloración obligada es Giemsa) para posteriores estudios (Fig. 42).

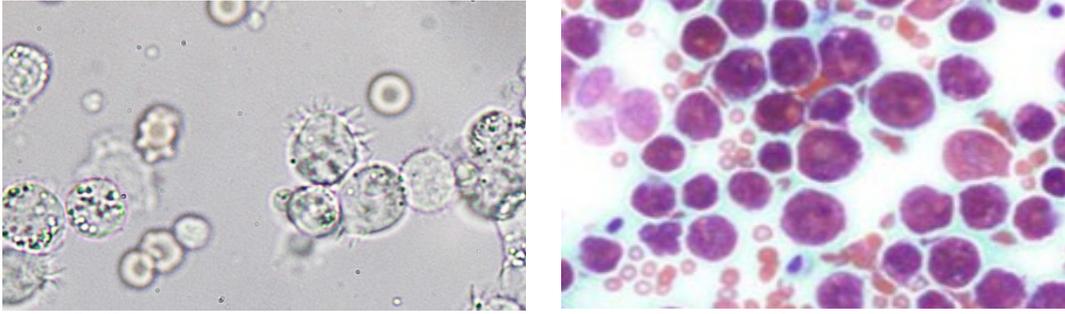


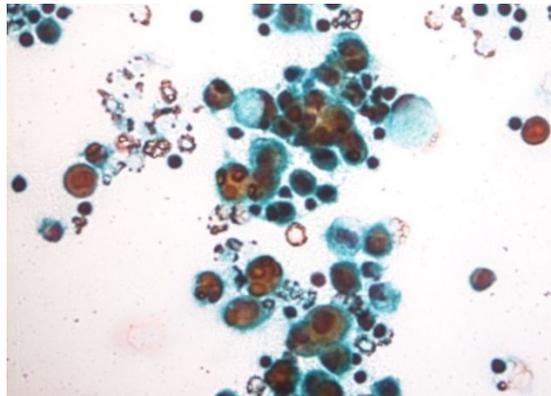
Figura 42. Células provenientes de una leucemia aguda en un LCR. Izquierda (Fresco), derecha (Giemsa) (80x). (autor: Dr. Luis Palaoro).

### RESOLUCIÓN DE CASOS CLÍNICOS

**1)** En un líquido de derrame pleural ligeramente turbio, amarillento, se obtienen los siguientes resultados de laboratorio: Proteínas 4,0 g/dL, recuento celular 850 células/mm<sup>3</sup>. El paciente describe fuerte dolor en un costado del tórax. Se adjunta, además, una microfotografía representativa del sedimento del líquido (coloración de Papanicolaou 400x).

a) Indique cuál de los siguientes diagnósticos serían, con mayor probabilidad, compatible con los resultados obtenidos:

- a) Insuficiencia cardíaca congestiva
- b) Lupus eritematoso
- c) Pleuritis inespecífica (completar con historia clínica)



**2)** Se obtiene líquido de punción pleural de un paciente de sexo masculino, 52 años, con fiebre de 5 días de evolución, esputo purulento, dolor pleurítico agudo.

Datos de laboratorio:

Aspecto amarillo turbio

- Recuento leucocitario: 24000/mm<sup>3</sup>

	Líqu. PLeural	Suero
• Proteínas(g/dL)	3,8	6,9
• LDH(UI/L)	1.100	250
• LDH L/S	4,4	
• Glucosa (mg/dL)	40	98
• pH:	6,8	
•		

- Recuento celular diferencial (Coloración de Giemsa)
  - Néutrófilos: 88%
  - Linfocitos: 9%
  - Monocitos; 3%
  - Otras células: macrófagos, mesoteliales reactiva.

a) ¿Cuál sería el presunto diagnóstico?

3) Una paciente cursa con ascitis de larga data.

Laboratorio:

Proteínas en ascitis: 4,1 g%

Proteínas en suero: 5,7 g%

Proteínas L/S: 0,72

LDH: 2.400 UI/L

Recuento celular: 2.600 leucocitos/mm<sup>3</sup> - 1.200 células epiteliales/mm<sup>3</sup> (dato aproximado por agrupamiento celular)

Aspecto del líquido: amarillento-rojizo, turbio.

La observación microscópica directa muestra:



a) Cuál sería el posible diagnóstico?

b) Qué otros estudios deberían realizarse para confirmar el diagnóstico?

## BIBLIOGRAFÍA

- Yalcin NG., Choong CK., Eizenberg N. (2013). Anatomy and pathophysiology of the pleura and pleural space. *Thorac Surg Clin.* 23(1):1-10.
- Angeleri A., Rocher A., Caracciolo B., Pandolfo M., Palaoro L., Perazzi B. (2016). New biochemical parameters in the differential diagnosis of ascitic fluids. *Gastroenterology Res.* 9(1):17-21.
- Angeleri A., Rocher AE., Caracciolo MB., Pandolfo M., Palaoro LA., Perazzi BE. (2016). Biochemical parameters in pleural fluids: New contributions in the etiologic diagnosis of body fluids. *BJMMR* 13(1): 1-9.
- Angeleri A., Ariagno J., Sardi M., Carbia C., Palaoro L., Rocher A. (2017). Comparación del recuento celular entre un método manual y un contador automatizado en líquidos de derrame. *Acta Bioq Clín Lat.* 51: 1-5.
- Subhani M., Sheth A., Palaniyappan N., Sugathan P., Wilkes EA., Aithal GP. (2022). Diagnostic accuracy of serum ascites albumin gradient (SAAG) in a contemporary unselected medical cohort. *J Int Med Res.* 50(11): 3000605221140310. doi: 10.1177/03000605221140310.
- Kopicinovic LM., Culej J. (2014). Pleural, peritoneal and pericardial effusions. A biochemical approach. *Biochemia Medica* 24: 123-137.
- Rocher AE., Guerra FR., Rofrano J., Angeleri A., Canessa OE., Mendeluk GR., Palaoro L. (2011). Sensitivity and specificity in the cytodagnosis of body fluids using Papanicolaou, Giemsa and AgNOR techniques. *Biotech Histochem* 86:326-332.
- Palaoro LA., Blanco AM., Gamboni M., Rocher AE., Rotenberg RG. (2007). Usefulness of ploidy, AgNOR and immunocytochemistry for differentiating benign and malignant cells in serous effusions. *Cytopathology* 18:33-9.
- Sakka L., Coll G., Chazal J. (2011). Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 128:309-316.
- Hepnar D., Adam P., Žáková H. (2019). Recommendations for cerebrospinal fluid analysis. *J.Folia Microbiol (Praha)* 64: 443-452.
- Rahimi J., Woehrer A.H. (2017). Overview of cerebrospinal fluid cytology. *Clin Neurol* 145:563-571.