Curso Preparatorio en Diagnóstico de laboratorio en la Clínica Médica de hoy

Bioq César Yené

CIRCULO MEDICO DE ROSARIO 1910

CIBIC
CENTRO DE DIAGNOSTICO MEDICO DE ALTA COMPLEJIDAD S.A.

Diabetes (ADA)

- **A. Clasificación:**

DM1(destrucción de células beta que lleva a deficiencia absoluta de insulina)

- **DM2** (defecto progresivo en la secreción de insulina, asociado a aumento en la resistencia a la insulina);
- **Diabetes gestacional** (diagnosticada durante el embarazo, que no cumple criterios posteriores de diabetes)
- Otros como los causados por defectos genéticos en la función de las células beta, defectos genéticos en la acción de insulina, enfermedad del páncreas exócrino (fibrosis quística) o inducida por sustancias químicas o medicamentos (tratamiento de HIV/ después de trasplante de órgano).

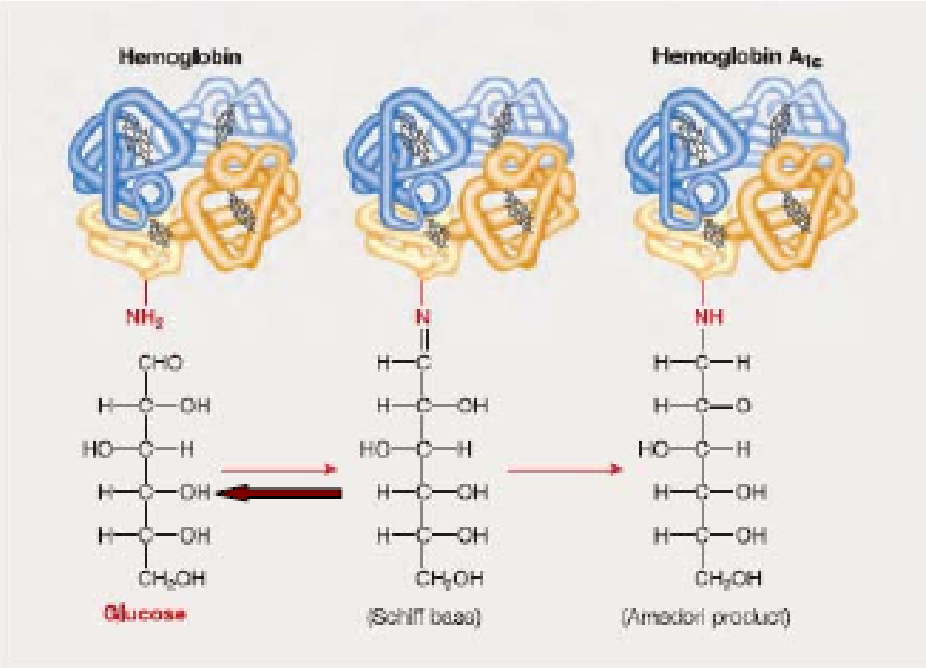
- **B. Diagnóstico de diabetes:** uno de los siguientes hace diagnóstico de DM2.

- A1C > 6.5% ó
- Glucemia en ayunas > 126 mg/dL ó
- Glucemia 2 horas después de prueba de tolerancia a glucosa oral > 200 mg/dl ó
- Glucemia tomada aleatoriamente >200 mg/dL

HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbG)

Hemoglobinas en el adulto:

Especie	Subespecie	Estructura	Azucar	Porcentaje
HbA0	-	$\alpha_2\beta_2$	----	>90%
HbA1 (rápidas)	HbA1a1	α_2(β-F-D-P)$_2$	Fructosa-1,6-bifosfato unida a la valina en Nt de la cadena β.	<1%
	HbA1a2	α_2(β-G-6-P)$_2$	Glucosa-6-fosfato unida a la valina en Nt de la cadena β.	<1%
	HbA1b	?		<1%
	HbA1c	$\alpha_2\beta_2$	Glucosa unida a la valina en Nt de la cadena β.	4-6%
	HbA1d	?	?	<0.1%
HbA2	-	$\alpha_2\delta_2$	----	2-3%
HbF	-	$\alpha_2\gamma_2$	----	0.8-2%

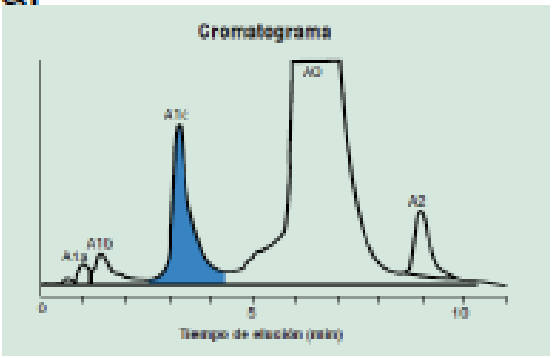


Biosíntesis de la HbA1c:

Modificación postraduccional de la HbA1.

Proceso no enzimático.

La velocidad de formación dependerá de la concentración de glucosa.



Un poco de historia...

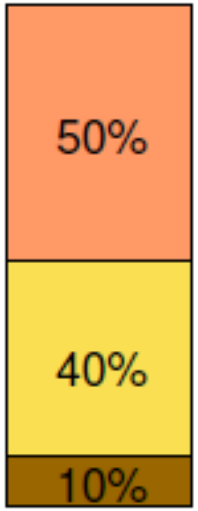
- **1958**: Allen separa por cromatografía de intercambio iónico al menos tres fracciones con carga más negativa que la HbA: HbA1a, HbA1b y HbA1c.
- **1968**: Rahbar descubre la **elevación** de estas Hb rápidas en pacientes **diabéticos**.
- A mediados de los **70**: se acepta la relación entre la Hb glicosilada, el promedio de la concentración de glucosa y las complicaciones a largo plazo de la diabetes.
- Desde principios de los **80** se extiende el análisis de hemoglobinas glicosiladas en el ámbito clínico

Vida media de la Hb glicosilada

=

Vida media del eritrocito

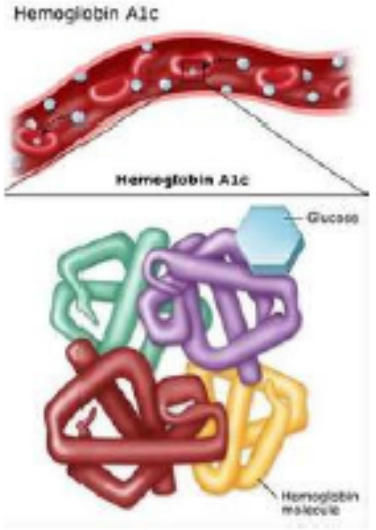
La concentración o el porcentaje de HbA1c se correlaciona con la glucosa media de los 120 días previos:



Glucemia media del último mes

Glucemia media entre los días 31-89

Glucemia de los días 90-120



Métodos para la determinación de HbA1c

I. Basados en diferencia de carga:

- Cromatografía de intercambio catiónico
- HPLC (intercambio catiónico)
- Electroforesis (gel o electroforesis capilar)

II. Basados en diferencias estructurales:

a) **Por afinidad:** al boronato; cuantifican **HbG total**

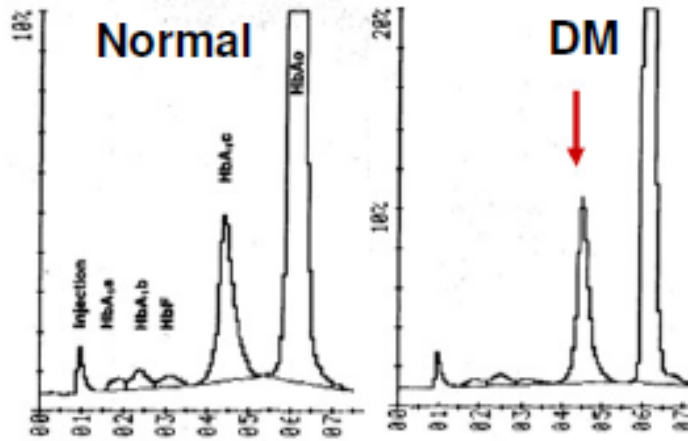
- Cromatografia de afinidad.
- HPLC de afinidad

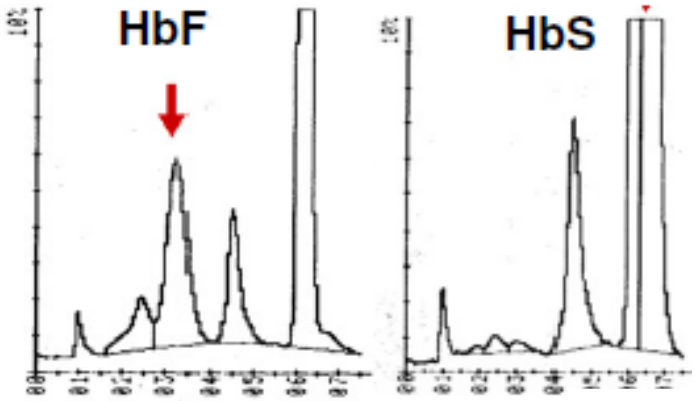
b) **Inmunoquímicos:**

- Inmunoturbidimetría
- Inmunoquimioluminiscencia
- Enzimoinmunoanálisis

Interferencias por variantes anormales de la Hb

- Variantes anormales o Hb químicamente modificadas (carbamilada) interfieren con algunos métodos de ensayo dando resultados falsamente aumentados o disminuidos.
- La cromatografía por afinidad al boronato se considera el método menos afectado.
- Los ensayos modernos no se ven afectados por HbS, HbC o E en heterocigosis.
- Debemos sospechar esta interferencia en:
  - Muestras con HbA1c > 15% o < 4%.
  - Cambios significativos respecto a los previos.





Otras proteínas glicosiladas

Fructosamina: proteínas séricas glicosiladas.

Albúmina glicosilada: vida media de 14-20 días.

- Los ensayos no están estandarizados
- No se han relacionado sus niveles con las complicaciones de la diabetes
- ¿Se deberían ajustar sus valores a la concentración total de albúmina?

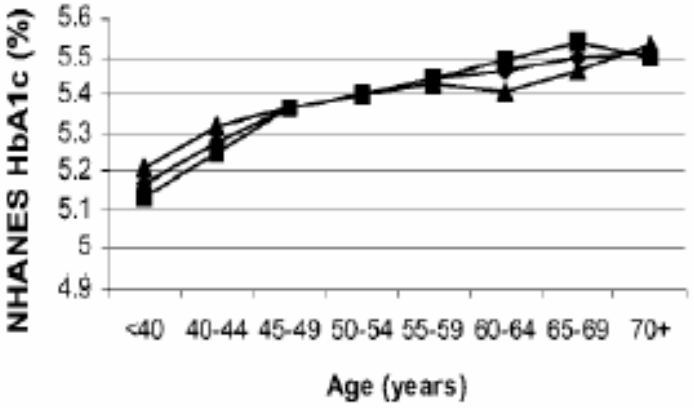
- Clínicamente superiores a la HbA1c en situaciones concretas:
  - Pacientes en hemodiálisis (EPO)
  - Insuficiencia renal crónica
  - Hemoglobinopatías severas.

- Su uso es necesario en circunstancias particulares.
- No deben de ser sustitutos rutinarios de la HbA1c.

Consideraciones preanalíticas

- La muestra puede ser obtenida por punción venosa o capilar.
- Los tubos han de llevar el anticoagulante recomendado por el fabricante; en general, EDTA.
- La estabilidad de la muestra depende del método; normalmente:
  - Hasta una semana a 4ºC
  - Al menos 1 año a -70ºC

- Existe un incremento de HbA1c con la edad: 0.1% por década de vida a partir de los 30 años.
- Diversos estudios muestran una mayor concentración en afroamericanos e hispanos frente a caucásicos.



Diabetes Care 31:1991–1996, 2008

Factores que alteran los niveles de HbA1c

Disponibilidad de glucosa	Concentración de glucosa en sangre Permeabilidad de la membrana eritrocitaria
Velocidad de glicación	Genética Toma regular de salicilatos Altas dosis de vitamina C y E Estrés oxidativo
Recambio eritrocitario	**Descenso de la eritropoyesis:** • Déficit de Fe o vitamina B12 • Fallo renal • Supresión en la médula ósea (embarazo, alcoholismo) **Aumento de la eritropoyesis:** • Terapia con Fe o EPO **Descenso de la hemólisis:** • Esplenectomía **Aumento de la hemólisis:** • Anemia hemolítica • Talasemia • Hemoglobinopatías • Esplenomegalia • Enfermedad hepática crónica • Farmacos (ribavirina, dapsona)

J of Int Med 2012; 271; 2272

Comparación de la HbA1c vs glucemia en ayunas en el diagnóstico

VENTAJAS

- ✓ Mejor índice de exposición a la glucemia
- ✓ Menor variabilidad biológica (2% vs 12-15%)
- ✓ Métodos estandarizados
- ✓ Mayor estabilidad
- ✓ No requiere ayuno
- ✓ Menor influencia por complicaciones agudas

INCONVENIENTES

- o Mayor coste
- o Interferencias:
  - o Hemoglobinopatias.
  - o Cambios en el recambio eritrocitario.
  - o Incremento con la edad y diferencias entre razas

Test de tolerancia oral a la glucosa

Se realiza la prueba en ayunas a las 8 hs.

Se realizan extracciones de sangre en el BASAL, 30', 60' 120' post ingesta de 75 g de Glucosa (en niños 1.75 g/kg peso hasta 75 g) diluida en 250 cc de líquido a tomar en 10 - 20', en ayunas.

Pueden hacerse dosajes de Insulina en todos los tiempos y recolección de orina (glucosuria).

Según OMS:

Glucemia: < 140 mg/dl a las 2 hs
Insulina : < 100 uU/ml a las 2 hs

Test de tolerancia oral a la glucosa

- Los valores sanguíneos normales para una prueba de tolerancia a la glucosa oral con 75 gramos utilizada para detectar diabetes tipo 2 son:

- *Ayunas*: 70 a 105 mg/dL

- *1 hora*: menos de 200 mg/dL

- *2 horas*: menos de 140 mg/dL.
- Entre 140 y 200 mg/dL se considera que existe deterioro en la tolerancia a la glucosa.
- Un nivel por encima de 200 mg/dL es un signo de diabetes mellitus.

Test de tolerancia oral a la glucosa

- Los valores sanguíneos normales para una prueba de tolerancia a la glucosa oral con 50 gramos utilizada para detectar diabetes gestacional (semana 24 – 28) son:

- *1 hora*: igual a o menos de 140 mg/dL.

- Los valores sanguíneos normales para una prueba de tolerancia a la glucosa oral con 100 gramos utilizada para detectar diabetes gestacional son:

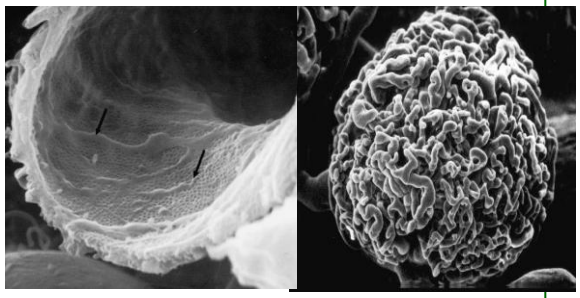
- Ayunas: menos de 105 mg/dL
- 1 hora: menos de 190 mg/dL
- 2 horas: menos de 165 mg/dL
- 3 horas: menos de 145 mg/dL

Microalbuminuria

- El riñón informa acerca del resto del árbol vascular .
- La albuminuria es un mensaje precoz del riñón acerca del estado del árbol vascular.

Microalbuminuria en la DM

- **El riñón informa precozmente acerca del resto del árbol vascular**
  - **Marcador de enfermedad de pequeños vasos tanto en riñón como en corazón**
  - **Indicador de lesión vascular**



- **Marcador precoz de nefropatía diabética y RCV**
- **Predictor de mortalidad cardiovascular**
- **Incrementa la tasa de mortalidad un 20-40 veces**

Afectación Renal en la Diabetes

25-30% DM tipo 1

25-40% DM tipo 2*

Nefropatía diabética
(proteinuria, HTA y ↓ progresivo función renal)

↑ **20 - 40 veces mortalidad CV**

Remuzzi G. *Nefrología* 2000.

Definición de microalbuminuria para riesgo de nefropatía

Muestra: Orina

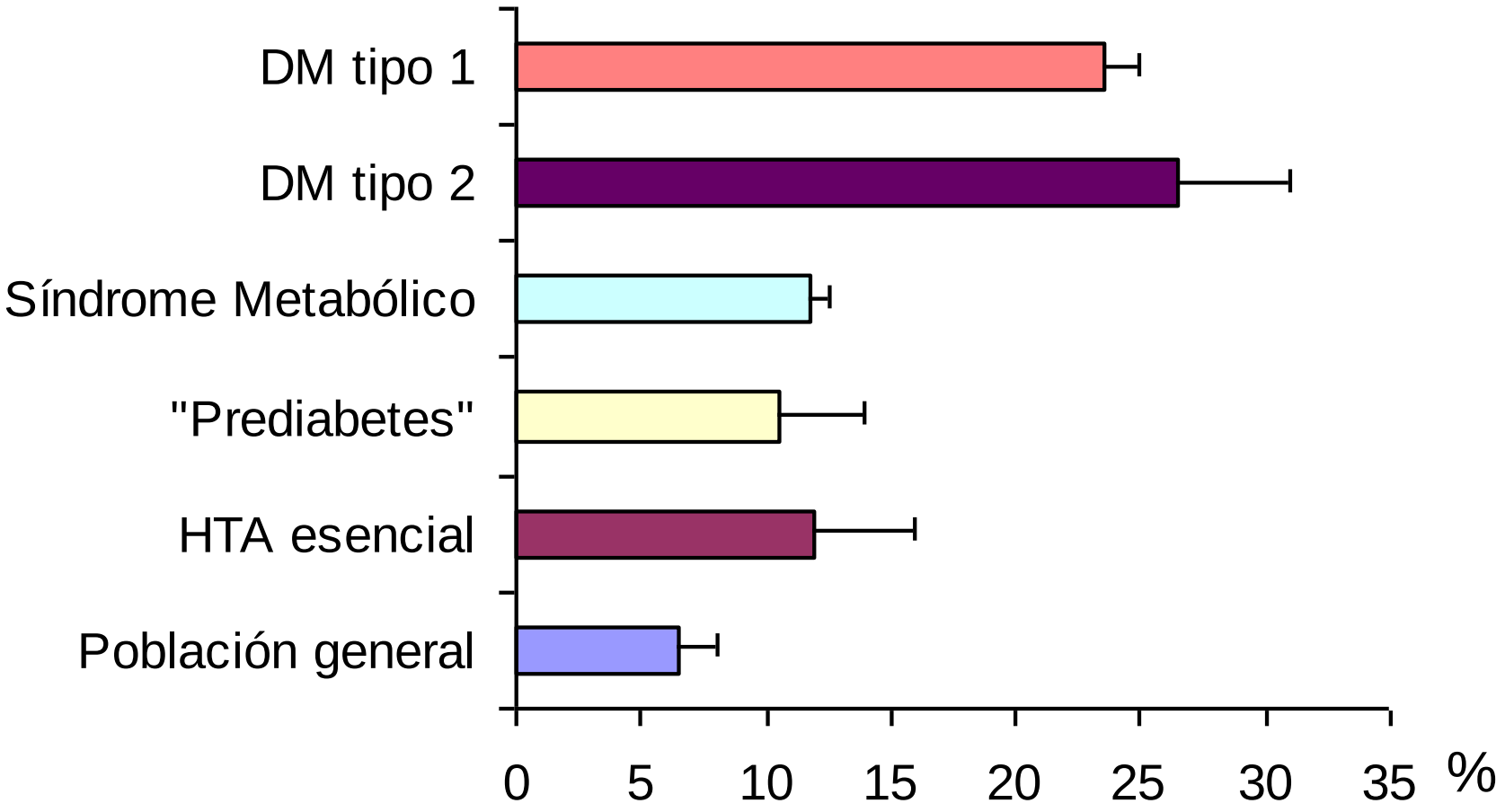
Unidades	*Aislada*	*Minutada*	*24 horas*
mg/24 h			>30
µg/min		>20	
mg/L	> 20		
µg/g Cr	> 20		

Parámetros que pueden influir en la albuminuria

INCREMENTO	INCIERTO	REDUCCIÓN	FACTORES R. (UKPDS)
P. ERECTA	**IMC**	**RAZA BLANCA**	**TASA INICIAL**
EJERCICIO	**EDAD**	**IECA** (HOPE, IRMA II)	**CONTROL GLUCEMIA**
>DIURESIS	**SEXO**	**AINE**	**RETINOPATIA D.**
DIURNO (25%+)		**ARA II** (MARVAL**)**	**TABAQUISMO**
ICC		**IECA+DIU** (PREMIER)	**DISLIPEMIA**
FIEBRE		**IECA+ARA II** (CALM**)**	**PA**
INF. VIAS U.			
FLUJO VAG.			

*Variación biológica entre días de un 40-50%.
*Dos de tres muestras + en 6 meses.

MAU - Prevalencia

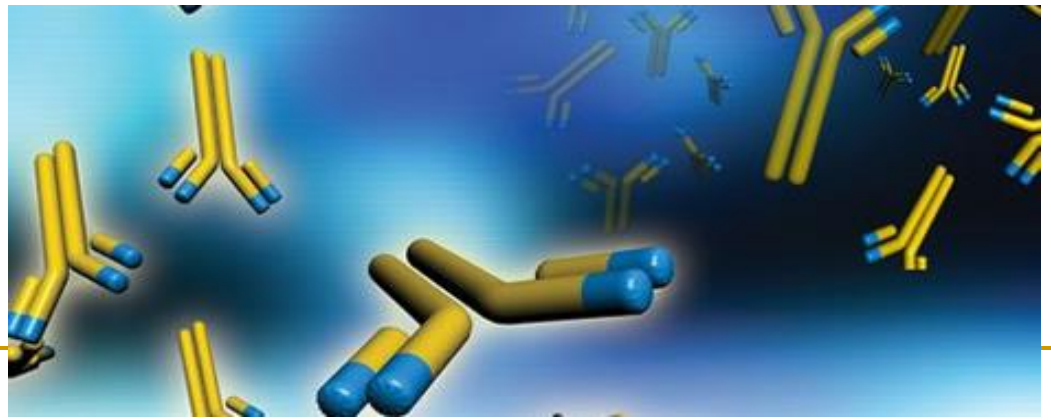


Microalbuminuria

- 30-40% de prevalencia de microalbuminuria en la diabetes tipo 2.
- Todos los diabéticos tipo 2 deberían ser sometidos a screening para microalbuminuria al momento del diagnóstico de diabetes, y anualmente a posteriori.
- La microalbuminuria progresa hacia Proteinuria franca hasta en un 50% de los diabéticos tipo 2 a los 5-10 años.

Autoanticuerpos

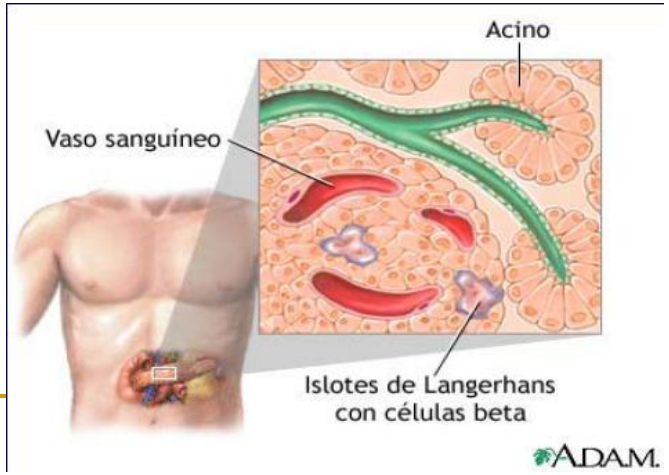
- **UTILIDAD**: permiten la predicción de la DM1A y la tipificación de la diabetes autoinmune en su inicio
- Se postula que los pacientes LADA con múltiples autoanticuerpos positivos y/o niveles altos de éstos tienen un fenotipo similar a los DM1.
- Aquellos con niveles bajos de GADA, tienen características clínicas similares a DM2, siendo independientes de la insulina durante varios años.



Autoanticuerpos

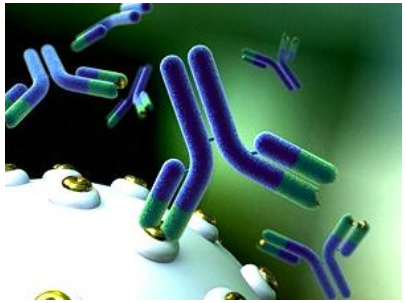
- ICA: Anticuerpos citoplasmáticos anti - células de los islotes pancreáticos.

- Preceden en años la aparición de síntomas y pueden desaparecer a los 5 – 10 años.
- Están dirigidos contra distintos antígenos: GAD, IA 2, GP3.
- Sensibilidad diagnóstica: 70 a 90 % en niños
- Especificidad 90 – 98 %
- Aparecen en 2 – 4 % de pacientes sanos



Autoanticuerpos

Ac a GAD (GAD 64). Ac a decarboxilasa del ácido glutámico.



- No varían con la edad
- No decaen en el tiempo
- Más sensible para la adolescencia y en LADA
- Puede aparecer en otras autoinmunes
- Aproximadamente el 70% de los pacientes caucásicos con DM1 de inicio los presentan y sus niveles son estables después de 10 años del diagnóstico.

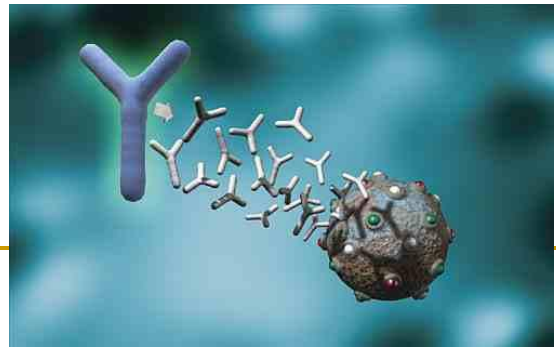
Ac a Insulina (IAA)

- Correlación inversa con la edad
- Mayor prevalencia en pacientes que debutan a edades más tempranas.
- Se relacionan con los ICA. La asociación de ambos predice mejor la insulinopenia y la destrucción pancreática.

Autoanticuerpos

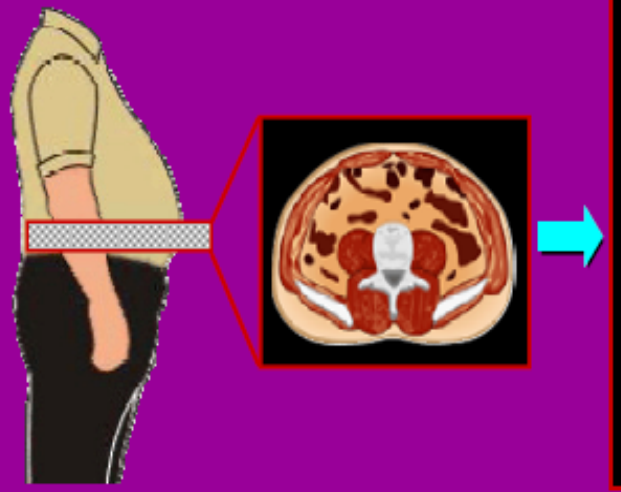
- IA-2 o ICA 512 (Ac a tirosina fosfatasa pancreática de membrana)
- Pertenece al grupo de los ICA
- Puede dar positivo en pacientes sin GAD o sin ICA.
- Aparecen en el 60% de los pacientes con DM1 de inicio.

- La presencia de ICA, GADA e IAA juntos implica una probabilidad del 100% de desarrollo de DMID.



SÍNDROME METABÓLICO

COMPONENTES

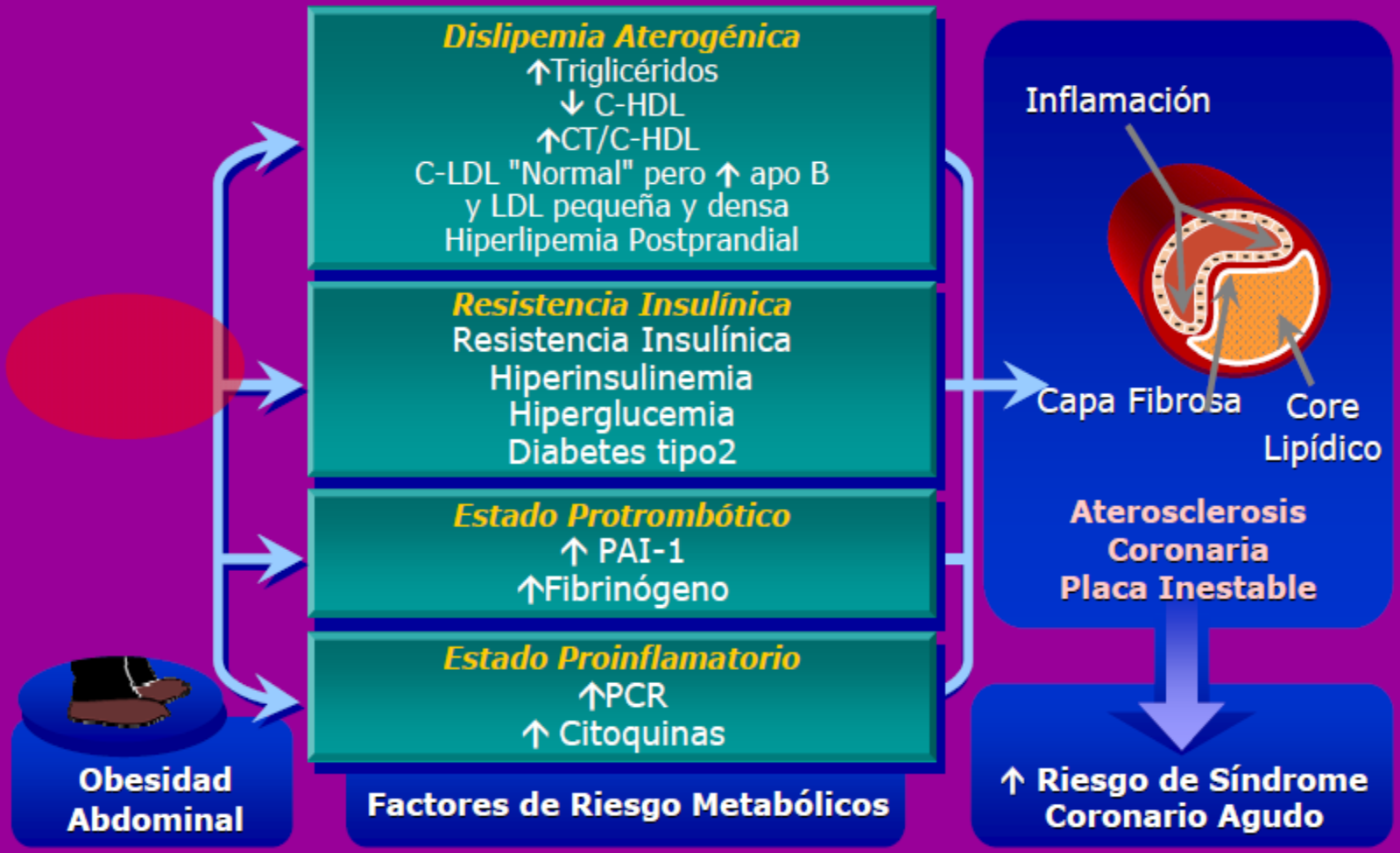


- Dislipemia Aterogénica
- Resistencia Insulínica
- Estado Proinfllamatorio
- Perfil Protrombótico
- Hipertensión Arterial (en más del 50%)

CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO

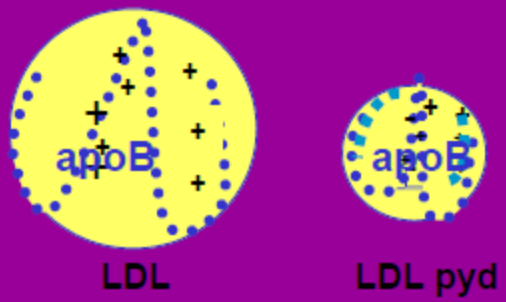
NCEP-ATPIII	IDF	WHO	EGIR	AACE	Cintura HTG	Otros
• Circunf. cintura	• Circunf. cintura	• Insulina	• Insulina	• Glucosa	• Circunf. cintura	?
• C-HDL	.....	• Glucosa	• Circunf. cintura	• IMC	• TG	
• TG	• C-HDL	• Cint/cad, IMC	• Glucosa	• C-HDL		
• Presión Arterial	• TG	• C-HDL	• TG	• TG		
• Glucosa	• Presión Arterial	• TG	• Presión Arterial	• Presión Arterial		
	• Glucosa	• Presión Arterial	• Glucosa	• Otras caract. de resist. insulínica		
		• Microalbuminuria				

Biomarcadores y Factores de Riesgo Nuevos y Clásicos



Adapted from Després JP, et al. *Progress in Obesity Research: 9;* 2003:29-35.
Gentileza Prof. Dr. Jean-Pierre Desprès

LDL pequeña y densa



- DISMINUCION EN LA UNION A RECEPTORES-LDL
- MAYOR PASAJE Y RETENCION EN PARED ARTERIAL
- ALTA AFINIDAD A PROTEOGLICANOS
- MAYOR OXIDABILIDAD
- FUERTE ASOCIACION CON HIPERTRIGLICERIDEMIA
- MARCADOR DE INSULINO-RESISTENCIA

Índices para la evaluación de resistencia insulínica durante el TTOG

G/I $\dfrac{\text{Glucemia ayunas (mg/dl)}}{\text{Insulina ayunas (µUI/ml)}}$

HOMA $\dfrac{\text{Ins. ay. (µUI/ml) X Gluc. ay. (mm/l)}}{22.5}$

QUICKI $\dfrac{1}{\text{Log. Ins. ayunas (µUI/ml) X Log. Gluc. ayunas (mg/dl)}}$

AI 30 X (Ins b + Ins 30’ + Ins 60’ + Ins 90’ + Ins 120’ (µUI/ml)

ISI composite $\dfrac{10000}{\sqrt{\text{(Gluc ay X Ins. ay.) X (promedio de gluc. del TTOG X promedio de ins. del TTOG)}}}$

CONCLUSIONES

- **Biomarcadores del SM:**
  - HOMA : punto de corte= 2,9

    *Haffner y col.: población mexicana-americana: 2,7

    *Coniglio y col.: población argentina (sur) : 3,1

    *Taniguchi y col.: Diabéticos tipo 2 no obesos: 2,5

  - Triglicéridos
  - Triglicéridos C-HDL

En ayunas

Glucemia/ Insulina basal

Menor de 4,5 → **Resistencia Insulínica**

Menor de 7.0 índice útil en las adolescentes

Debe ser completado con TTOG y perfil lipídico para evaluar riesgo. Evaluar periodicamente

↓

Cambios de estilo de vida

Laboratorio de lípidos

1- Aspecto del suero

Colesterol Total

TG

HDL

LDL

TG/HDL: Marcador secundario de IR > 3 - 3.5

+

2- APO B

3 ↓ Colesterol LDL / APO B

< 1 – 1,3

Indicador de la cantidad de partículas aterogénicas

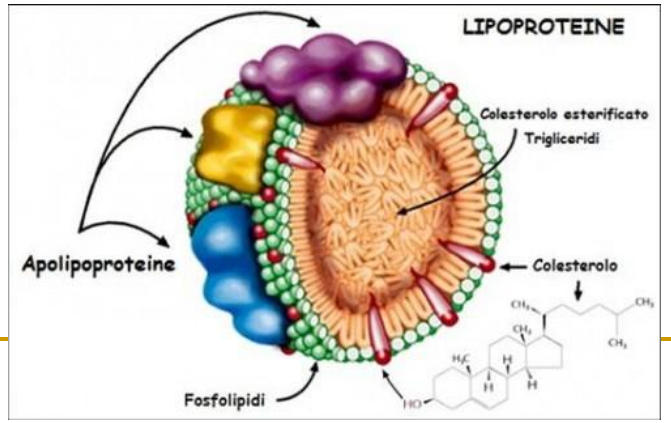
Estimativo de LDL pequeña y densa

Apolipoproteina B

Es el principal componente polipeptídico de las LDL y constituye aproximadamente el 80% de esta lipoproteína.

- **Parámetro altamente sensible**
- **Buen predictor de riesgo CV**
- **Buen predictor de respuesta a estatinas**
- **CV Analítico: 3 - 4%**

- **66 - 133 mg/dl** (hombres)
- **60 - 117 mg/dl** (mujeres)



SHBG como marcador de Insulino resistencia

Hombres: 17 – 65 nmol/l
Mujeres premonopáusicas: 26 – 110 nmol/l
Mujeres posmonopáusicas: 14 – 69 nmol/l

Baja variabilidad biológica intraindividual

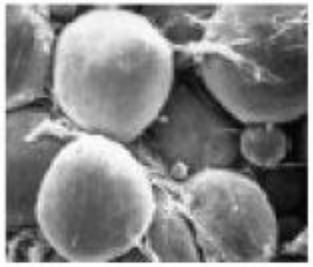
SHBG y Síndrome metabólico

Un valor bajo de SHBG está asociado con mayor riesgo de ECV y sería un marcador de riesgo independiente para desarrollar Diabetes tipo 2.

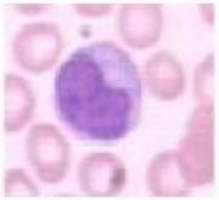
Se lo propone como Marcador integral de IR

JCEM. 2006 Mar;91(3):843-50

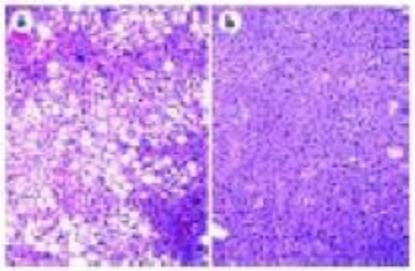
Acciones biológicas de la adiponectina



Músculo:
Oxidación lipidos↑
Recaptación de Glucosa↑



Monocitos:
Adhesión ↓
Proliferación ↓
Fagocitosis ↓
Deposición Lipídica ↓

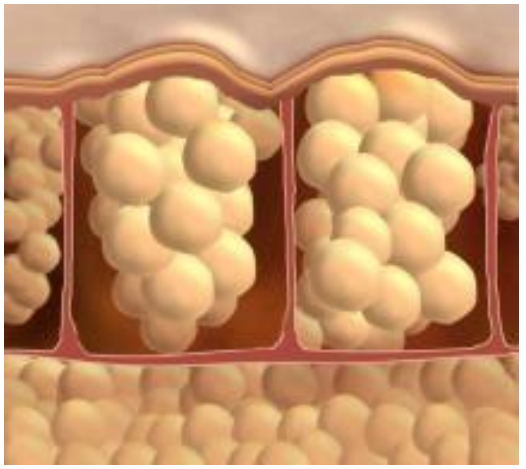


Higado:
Sensibilidad a la Insulina↑
Gluconeogenesis↓

Arterias:
Adhesión de moleculas ↓
Proliferación y migración ↓
Formación Neointima ↓

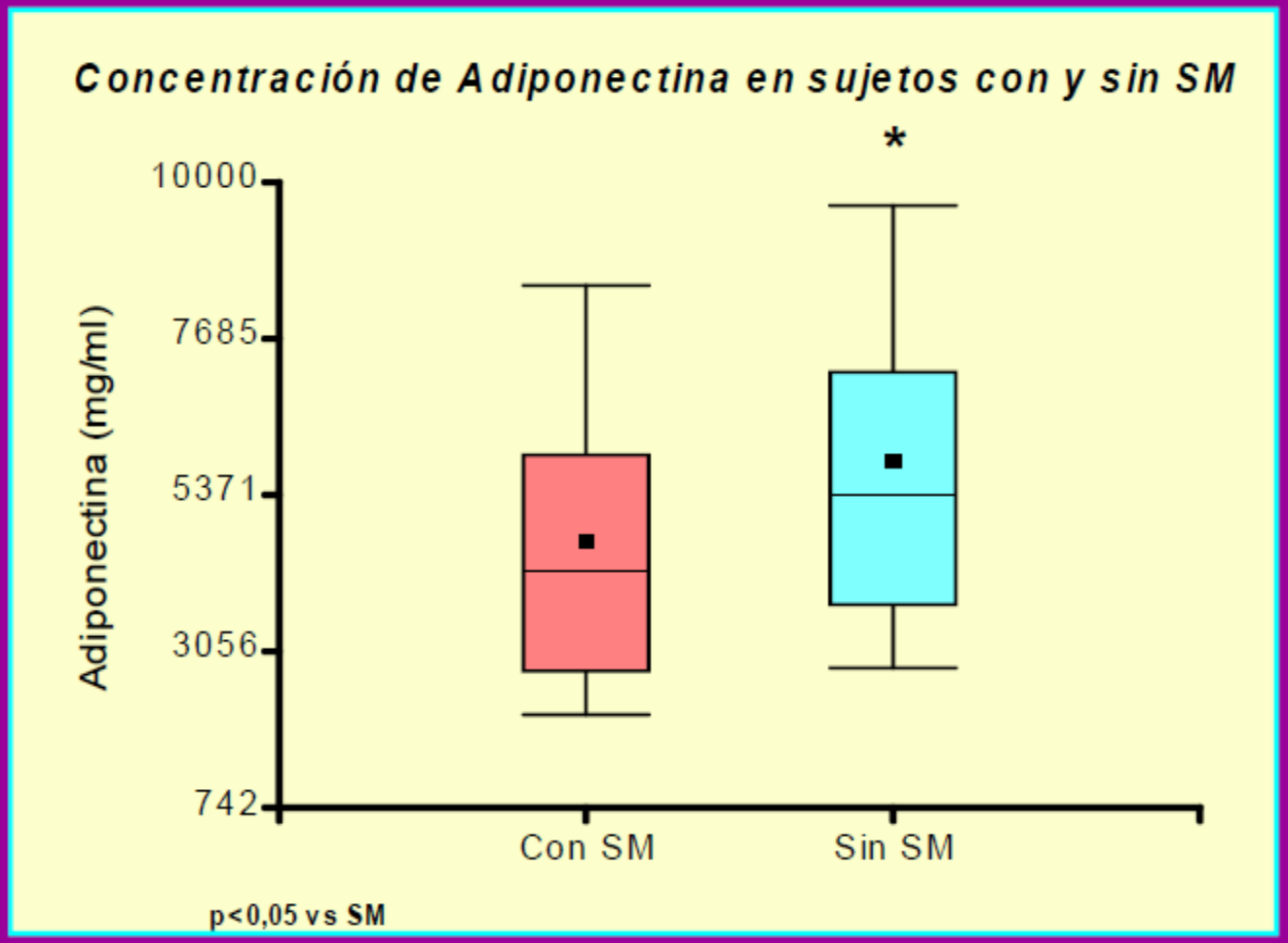
Adiponectina

"Un Nuevo Marcador Lider "



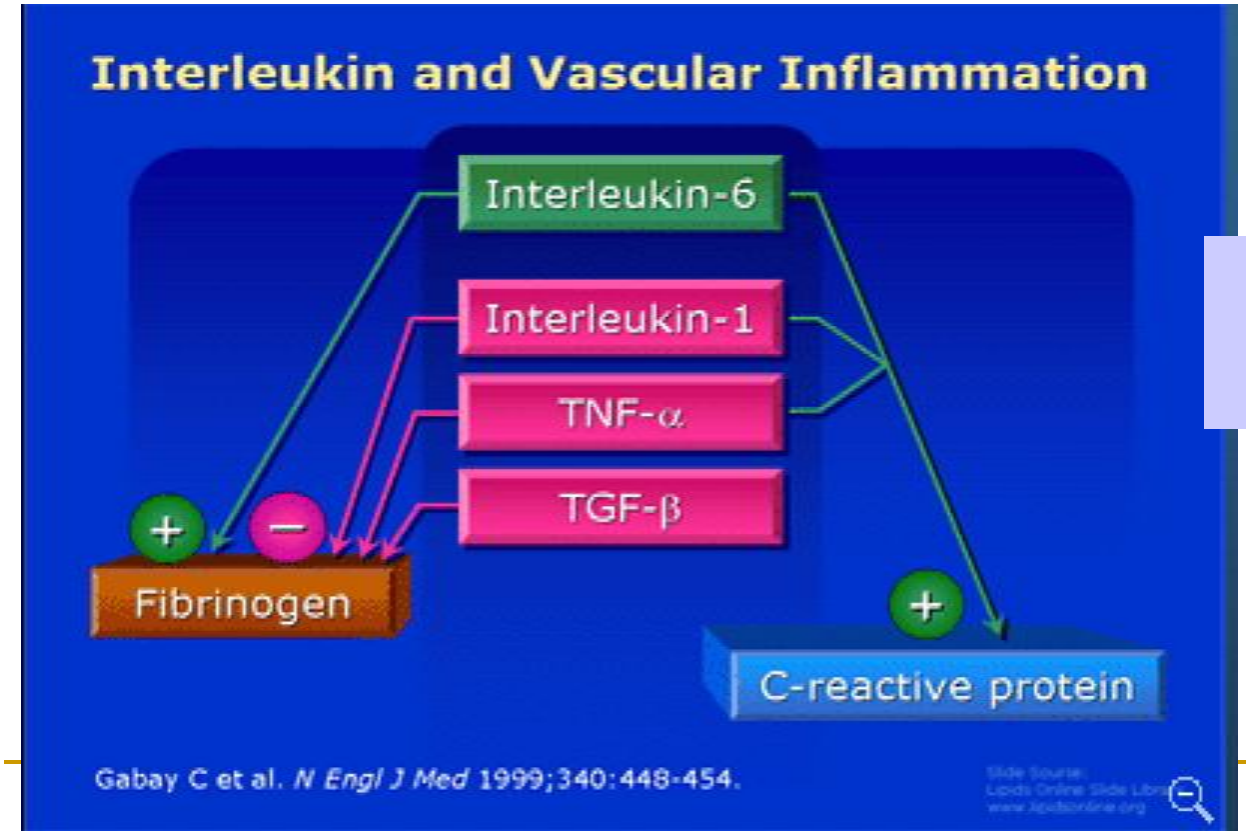
- ✓ Es una proteína anti-inflamatoria
- ✓ Circula con una concentración de 5-10 ug/mL.
- ✓ Es estable y reproducible
- ✓ Su nivel disminuye considerablemente en pacientes con Obesidad abdominal, aunque está más estrechamente relacionado con la resistencia a la insulina y a la hiperinsulinemia.

Adiponectina



PCRus

Es una proteína de fase aguda liberada por el hígado en respuesta a citoquinas inflamatorias.
Macrófagos presentes en la placa ateroesclerótica son los principales productores.



Variedad de efectos proaterogénicos en tejido vascular

PCRus

Correlaciona con los componentes del SM NCEP ATP III
Correlaciona con leptina e IR y negativamente con adiponectina, aún pacientes con IMC normal

- ✓ *Es un predictor independiente de riesgo CV e IR*
- ✓ La combinación de lipidos y PCR incrementa el valor pronóstico
- ✓ Es de utilidad en pacientes con LDL normal
- ✓ PCR y LDL correlacionan minimamente e identifican diferentes individuos con riesgo CV.

Ridker PM. *Circulation* 107: 363-369, 2003
Ridker PM, *N Engl J Med*. 2002; 347: 1557-1565.

PCRus

- ✓ Es un marcador sensible pero inespecifico de inflamación
- ✓ Vida media de 18 h
- ✓ Es estable
- ✓ No presenta ritmo circadiano ni estacional
- ✓ No requiere ayuno
- ✓ Aumenta con la edad
- ✓ Sin diferencia según género
- ✓ Valores mas altos en mujeres con TH

Circulation 100: 230-235, 1999
Clin Chem 47: 444-450, 2001

PAI 1

PCR induce la expresión de (PAI)-1 en cel endoteliales

Un aumento en la concentración del PAI-1 aumentaría el riesgo de enfermedades cardiovasculares de origen trombótico.

Sus niveles aumentados se asocian a obesidad abdominal

La mayor síntesis de I- PAI en obesos hiperinsulinémicos, junto a la hiperfibrinogenemia son los principales responsables de la hipercoagulabilidad y mayor riesgo de eventos cardiovasculares en obesos, potenciado por la mayor agregación plaquetaria inducida por la hiperleptinemia.

Sobel et al, 1996

Es un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular.

Test de TRH

- **Estímulo**: TRH (TRH-ELEA o TRH Ferring) intravenoso en bolo en 2 minutos

- **Dosis**:
  Adultos: 200 ug
  Niños: 9 ug/kg. de peso

- **Dosaje**: TSH
- **Tiempos de extracción**: Basal: entre las 8.00 a.m. y las 9.30 a.m.

- **Post**: 20, 30 Y 60 minutos
  Si no se especifican los tiempos se realizan las extracciones basal y post 30 minutos.

- **Condiciones previas del paciente**:
  El paciente deberá concurrir al laboratorio a las 8 horas, en ayunas y con reposo previo.
  Luego de la inyección endovenosa, el paciente deberá permanecer en el laboratorio para las posteriores extracciones de sangre que se realizarán según indicación médica.
  Si está tomando alguna medicación para la función hormonal, deberá tomarla después de haber realizado el estudio.

PRUEBA TRH/ TSH

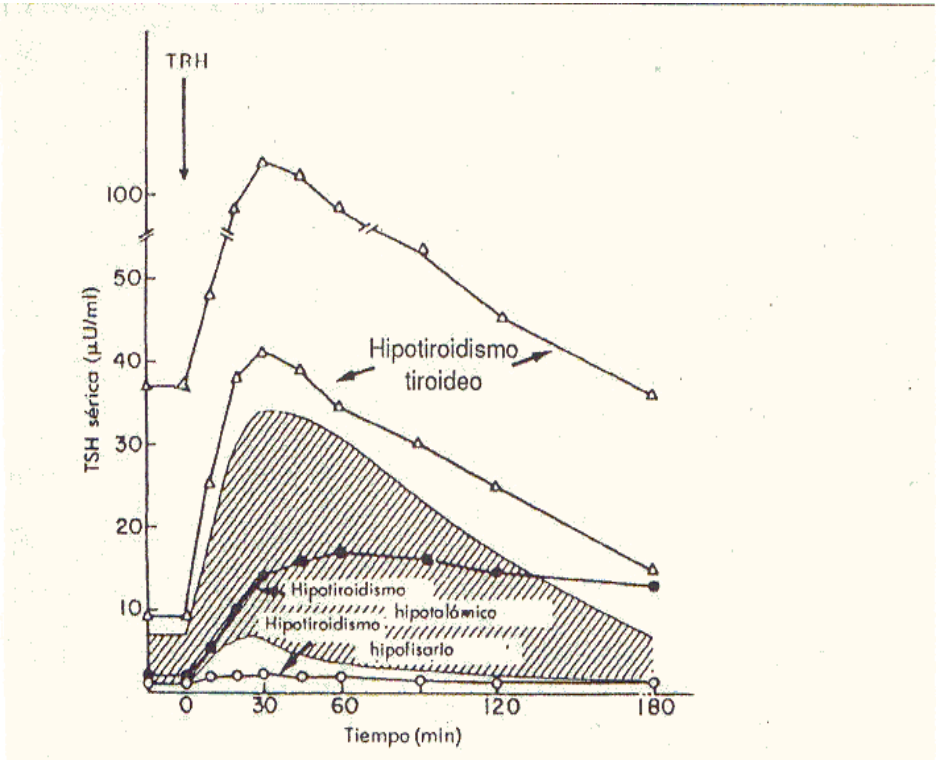
Valor Delta entre la respuesta máxima y el basal dan el tipo de curva

PLANAS: < 3.0 uUI/ml

SUBNORMAL: > 3.0 y < 4,7 UI/ml

NORMAL: > 4,7 y < 25 uUI/ml

HIPERRESPUESTAS: > 25 uUI/ml



PRUEBA TRH/ TSH

(-)

Edad avanzada
Ayuno
Anorexia nerviosa
Depresión endógena unipolar
Toma de medicamentos:
- Agonistas Dopaminérgico
- Salicilatos
- Tratamientos adelgazantes
- Glucocorticoides
- Somatostatina
- Alcohol

Alteraciones renales
hepáticas

(+)

Sindrome de T3 baja
Depresión bipolar
Enfermedad sistémica
Toma de medicamentos:
- Beta bloqueantes Amiodarona
- Neurolépticos Metoclopramida
- Anticonceptivos orales

Anticuerpos antitiroideos

La ausencia de anticuerpos antitiroideos con TSH basal normal con prueba de TRH/TSH patológica orienta a la posibilidad de una disfunción tiroidea Subclínica. (30% de los pacientes)

La presencia de anticuerpos antitiroideos tiene gran valor predictivo de una disfunción autoinmune tiroidea, aún con TSH basal normal.

Acs a Tiroglobulina.
Ac a TPO.

cyene@cibic.com.ar