

- REVISTA DE -

MEDICINA DE LABORATORIO

ISSN (versión papel): 2660-7484

ISSN (versión electrónica): 2660-7638

Vol. 2 Núm. 1 | enero-abril 2021 | Págs. 1-45

Editorial

Hacia un laboratorio líder 1
M. Salinas La Casta

Originales

Estudio comparativo entre diferentes métodos para la determinación de la calprotectina fecal 3
R. Cabra-Rodríguez, M. Á. Castaño López, A. M. Serrano Mira, A. León-Justel, I. Vázquez Rico, J. M. Vázquez Morón, F. Navarro Roldán

Rangos de referencia de cadenas ligeras libres en suero de Trimerio Diagnostic por turbidimetría. ¿Pueden ser universales los puntos de corte? 11
L. J. Morales-García, M. S. Pacheco-Delgado

Revisiones

Utilidad de los algoritmos de priorización de variantes con significado clínico desconocido en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario 21
V. Castillo Guardiola, M.ª D. Sarabia Meseguer, L. Rosado Jiménez, M. Marín Vera, J. A. Macías Cerrolaza, E. Cuevas Tortosa, F. Ruiz Espejo, J. A. Noguera Velasco

La metabolómica como herramienta hacia la medicina personalizada en diabetes mellitus tipo 2 30
M. Cortés Tormo, J. V. Marcos Tomás, V. Giner Galvañ, J. Redón i Mas

Caso Clínico

Microdelección 8p23.1 en un paciente con trastorno generalizado del desarrollo y diagnóstico genético 41
M.ª E. Pineda Ciscar, L. Segrelles Vaya, P. López García

Imagen/Infografía

Cristales de amoxicilina en orina 45
R. Cabra-Rodríguez, E. Lepe-Balsalobre, A. Cía-González

©AEBM-ML (2021)
©AEFA (2021)
©Arán Ediciones, S.L. (2021)

La *Revista de Medicina de Laboratorio* es una revista open access, lo que quiere decir que todo su contenido es accesible libremente sin cargo para el usuario individual y sin fines comerciales. Los usuarios individuales están autorizados a leer, descargar, copiar, distribuir, imprimir, buscar o enlazar a los textos completos de los artículos de esta revista sin permiso previo del editor o del autor, de acuerdo con la definición BOAI (Budapest Open Access Initiative) de open access. La reutilización de los trabajos puede hacerse siempre y cuando el trabajo no se altere en su integridad y sus autores sean adecuadamente referenciados o citados en sucesivos usos, y sin derecho a la producción de obras derivadas

Esta revista se publica bajo la licencia CC BY-NC-SA (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>)



ISSN electrónico: 2660-7638
ISSN papel: 2660-7484
Publicación cuatrimestral
Depósito legal: M-14367-2021

Edición y administración:



Arán Ediciones, S.L.
Castelló, 128, 1.º
Tel. +34 91 745 17 29
28006 Madrid (España)

Suscripciones:

Tarifa de suscripción anual (España):

Profesionales 95 € + IVA - Instituciones 120 € + IVA

Tarifa de suscripción anual (internacional):

250 € + IVA

Aran Ediciones, S.L.
Castelló, 128, 1.º - 28006 Madrid (España) - Teléfono: +34 91 745 17 29
Correo electrónico: suscripc@grupoaran.com

Reservados todos los derechos. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, transmitida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, incluyendo fotocopias, grabaciones o cualquier sistema de recuperación de almacenaje de información, sin la autorización por escrito del titular del Copyright.

La editorial declina toda responsabilidad sobre el contenido de los artículos que aparezcan en esta publicación.

www.revistamedicinadelaboratorio.es



DIRECTOR

Dr. Fernando Bandrés Moya
(Universidad Complutense de Madrid, Madrid)
bandres@ucm.es

Equipo Directivo

EDITORA JEFE

Dra. M.^a del Rosario Caro Narros
(Complejo Asistencial de Segovia, Segovia)
rcaro@saludcastillayleon.es

EDITORES

Dr. Vicente Morales Elipe
(Hospital General Universitario de Ciudad Real,
Ciudad Real)
vmelipe@sescam.jccm.es

Dr. Enrique Rodríguez Borja
(Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia)
enrobor@gmail.com

Editores Asociados

Díaz-Flores Estévez, Felicitas
(Complejo Hospitalario Universitario de Canarias. San
Cristóbal de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife)
fdiazflo@ull.edu.es/fdiaest@gobiernodecanarias.org

Gil Ruiz, María Teresa
(Hospital General Nuestra Señora del Prado
de Talavera de la Reina, Toledo)
tgruiz@sescam.jccm.es

Kabaroglu, Ceyda
(Department of Clinical Biochemistry. School of
Medicine. Ege University. Izmir, Turkey)
ckabaroglu@gmail.com

Laserna Mendieta, Emilio
(Unidad de Investigación del Hospital General
de Tomelloso, Ciudad Real. Instituto
de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario
de La Princesa, Madrid)
ejlaserna@gmail.com

López Gómez, Juan Manuel
(Hospital Univ. de Badajoz, Badajoz)
lopezhospi@gmail.com

Martínez Triguero, María Luisa
(Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia)
martinez_mlutri@gva.es

Pérez García, Lourdes
Laboratorio de Análisis Clínicos.
Complejo Asistencial de Palencia. Palencia

Pineda Tenor, Daniel
(Hospital de Antequera. Área de Gestión Sanitaria
Norte de Málaga)
dpinedatenor@gmail.com

Villalta Robles, Victoria
(Complejo Asistencial de Segovia, Segovia)
villaltarobles@gmail.com

Consejo Asesor

Rui Manuel Amaro Pinto
Profesor en la Facultad de Farmacia.
Universidad de Lisboa. Portugal

Adela Castañeda de la Mata
Especialista en Hematología y Hemoterapia.
Hospital Universitario de Fuenlabrada.
Fuenlabrada, Madrid. España

Gilbert C. Faure
MD, PhD. Laboratoire d'Immunologie.
Faculté de Médecine.
Université Lorraine and CHU Nancy. France

Jesús Miguel García-Foncillas
Director, Translational Oncology Division.
Research Institute FJD-UAM. Madrid, España

Montserrat González Estechea
Jefe de Servicio de Bioquímica Clínica.
Hospital General Universitario Gregorio Marañón.
Madrid, España

Juan Miguel Guerrero Montávez
Jefe de Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital
Universitario Virgen del Rocío. Sevilla. Catedrático
vinculado a la Universidad de Sevilla. Sevilla, España

Gustav Kovac
Slovak Medical University: Institute of Chemistry,
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.
Bratislava, Slovak Republic

Vesna Kusec
MD PhD. University Hospital Centre Zagreb. Clinical
Institute of Laboratory Diagnosis Zagreb. Croatia

Juan Ernesto del Llano-Señaris
Presidente de la Fundación Gaspar Casal.
Madrid, España

Franklin Marques
Profesor de la Facultad de Farmacia. Universidad
de Porto. Laboratorio de Bioquímica. Porto, Portugal

Luis Nogueira Martins
Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa.
Lisboa, Portugal

Leverton Ortiz Cáceres
Jefe del Laboratorio Clínico. Hospital de la Serena.
Chile

Wytze Pier Oosterhuis
Zuyderland Medical Center. Heerlen/Sittard.
The Netherlands

M.^a del Carmen Pasquel
Directora General Revista DIV/RIA/IFCC.
Asesora Regional de la Fundación Wiener. Ecuador

Patrick Twomey
Professor. Consultant Chemical Pathologist.
Head of Department/Laboratory Director for Clinical
Chemistry. St. Vincent's University Hospital.
Dublin, Ireland

Roberto Verna
MD PhD. Professor Faculty of Medicine.
Sapienza University of Rome. President of World
Association of Societies of Pathology and
Laboratory Medicine. President of World Pathology
Foundation. Rome, Italy



Santiago Prieto Menchero

**Presidente de la Asociación Española
de Biopatología Médica-Medicina de Laboratorio (AEBM-ML)**



Antonio Rider Pérez

**Presidente de la Asociación Española
del Laboratorio Clínico**





- REVISTA DE -
**MEDICINA DE
LABORATORIO**

www.revistamedicinadelaboratorio.es

Vol. 2 Núm. 1 | enero-abril 2021

Sumario

Editorial

Hacia un laboratorio líder 1
M. Salinas La Casta

Originales

Estudio comparativo entre diferentes métodos para la determinación
de la calprotectina fecal 3
*R. Cabra-Rodríguez, M. Á. Castaño López, A. M. Serrano Mira, A. León-Justel,
I. Vázquez Rico, J. M. Vázquez Morón, F. Navarro Roldán*

Rangos de referencia de cadenas ligeras libres en suero de Trimerio
Diagnostic por turbidimetría. ¿Pueden ser universales los puntos de corte? 11
L. J. Morales-García, M. S. Pacheco-Delgado

Revisiones

Utilidad de los algoritmos de priorización de variantes con significado clínico
desconocido en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario 21
*V. Castillo Guardiola, M.ª D. Sarabia Meseguer, L. Rosado Jiménez, M. Marín Vera,
J. A. Macías Cerrolaza, E. Cuevas Tortosa, F. Ruiz Espejo, J. A. Noguera Velasco*

La metabolómica como herramienta hacia la medicina personalizada
en diabetes mellitus tipo 2 30
M. Cortés Tormo, J. V. Marcos Tomás, V. Giner Galvañ, J. Redón i Mas

Caso Clínico

Microdelección 8p23.1 en un paciente con trastorno generalizado
del desarrollo y diagnóstico genético 41
M.ª E. Pineda Ciscar, L. Segrelles Vaya, P. López García

Imagen/Infografía

Cristales de amoxicilina en orina 45
R. Cabra-Rodríguez, E. Lepe-Balsalobre, A. Cía-González



- REVISTA DE -
**MEDICINA DE
LABORATORIO**

www.revistamedicinadelaboratorio.es

Vol. 2 No. 1 | January-April 2021

Summary

Editorial

Towards a leader laboratory 1
M. Salinas La Casta

Originals

Comparative study between different methods for the determination of fecal calprotectin 3
R. Cabra-Rodríguez, M. Á. Castaño López, A. M. Serrano Mira, A. León-Justel, I. Vázquez Rico, J. M. Vázquez Morón, F. Navarro Roldán

Serum free light chains reference ranges from Trimeric Diagnostic by turbidimetry. Are the guidelines' cut-offs universal? 11
L. J. Morales-García, M. S. Pacheco-Delgado

Reviews

Utility of algorithms for prioritization of variants with unknown significance in hereditary breast and ovarian cancer 21
V. Castillo Guardiola, M.ª D. Sarabia Meseguer, L. Rosado Jiménez, M. Marín Vera, J. A. Macías Cerrolaza, E. Cuevas Tortosa, F. Ruiz Espejo, J. A. Noguera Velasco

Metabolomics as a tool towards personalized medicine in type 2 diabetes mellitus 30
M. Cortés Tormo, J. V. Marcos Tomás, V. Giner Galvañ, J. Redón i Mas

Case Report

Microdeletion 8p23.1 In a patient with generalized developmental disorder and genetic diagnosis 41
M.ª E. Pineda Ciscar, L. Segrelles Vaya, P. López García

Image/Inphographic

Amoxicillin crystals in urine 45
R. Cabra-Rodríguez, E. Lepe-Balsalobre, A. Cía-González



Hacia un laboratorio líder

Towards a leader laboratory

Es altamente conocido que los datos de laboratorio intervienen en el 70 % de las decisiones clínicas. De hecho, y en la vida real, la Medicina de Laboratorio es la especialidad médica que más pacientes atiende. Sirva como ejemplo nuestro Departamento de Salud, que cubre las necesidades sanitarias de un cuarto de millón de habitantes y en el que cada día se solicita una exploración analítica a más de 1.000 pacientes. Ninguna otra especialidad médica, ni siquiera el Diagnóstico por Imagen, interviene tan frecuentemente en el proceso global de atención al paciente. Este hecho implica que la Medicina de Laboratorio sea también la especialidad que a más pacientes puede beneficiar.

Pero para que esto sea una realidad es importante tener claros al menos dos hechos. El primero es que los profesionales que trabajamos en la Medicina de Laboratorio debemos de ser conscientes de ello y actuar en nuestro día a día en consecuencia, tomando las riendas, actuando y haciendo realidad dicho beneficio en el paciente. El segundo hecho es que somos los únicos que podemos actuar a este nivel. Esto se debe principalmente a la carencia en las Facultades de Medicina de asignaturas relacionadas con la Medicina de Laboratorio, con un número de horas impartido nulo o casi nulo y muy inferior al de áreas como Anatomía Patológica, Microbiología o Diagnóstico por Imagen, especialidades que paradójicamente el médico empleará en mucha menor medida a lo largo de toda su vida profesional. Una encuesta a médicos de Atención Primaria, residentes y estudiantes de Medicina reveló el escaso o casi nulo conocimiento de estos tres colectivos acerca de conceptos tan básicos de las ciencias de la Medicina de Laboratorio, como son las variabilidades analítica, preanalítica y biológica (1).

Si la Medicina de Laboratorio es la especialidad que más puede beneficiar al paciente, y el profesional de Laboratorio el que tiene que actuar para conseguirlo, el siguiente paso será cómo hacerlo realidad en nuestro día a día. La solución está en evolucionar desde un modelo de Laboratorio tradicional hacia el *modelo de laboratorio líder*, mediante un sistema de gestión (SG) que comprenda gestión de la demanda (GD) y gestión de resultado (GR). A diferencia del tradicional, el laboratorio líder orienta sus esfuerzos a la mejora de la primera y la última etapa del ciclo de laboratorio; esto es, a la correcta solicitud de la prueba y la acción tomada tras su resultado (2).

Un SG junto a todo lo que comprende (*Misión, Visión, Valores, Objetivos y Planes de Acción* para su consecución, con los Indicadores y sus Metas para monitorizarlo) es la herramienta que dispone cualquier organización para conseguir resultados. La *misión* de la Medicina de Laboratorio, a lo que nos dedicamos o nuestra razón de ser, no es emitir resultados de pruebas sino la *prevención, diagnóstico, seguimiento y tratamiento* de la enfermedad. La *visión*, a donde se dirige la organización, cambia en el tiempo a medida que la organización va madurando, así como los *valores*.

Podríamos definir tres modelos de Laboratorio. El modelo "tradicional" estaría enfocado eminentemente en la etapa analítica. Interviene en la decisión clínica, procesando todas las pruebas solicitadas por el médico para corroborar o descartar su hipótesis. En este caso la Medicina de Laboratorio es un servicio meramente auxiliar o de apoyo al proceso global de atención al paciente (3). "*Ser líderes en calidad analítica*" podría ser su *visión*.

El segundo modelo, el Laboratorio "tecnológico", estaría enfocado principalmente a las etapas pre- y posanalíticas. También interviene en la decisión clínica, pudiendo realizar gestión de la demanda del exceso de solicitud (GDE) y en cuanto a gestión del resultado, notificando el resultado crítico. La Medicina de Laboratorio sigue siendo en este modelo un servicio auxiliar o de apoyo (3). Con la utilización de la nueva tecnología logra procesar el aumento creciente de la carga de trabajo pero corre el riesgo de convertirse en una fábrica expendedora de números. Además, en ocasiones, mediante el uso de perfiles y algoritmos sobredimensionados, contribuye de forma unilateral al exceso de la demanda. La *visión* del laboratorio tecnológico podría ser "*ser líderes en sistemas de calidad*".

Por último, el modelo de *laboratorio líder* estaría enfocado principalmente en las etapas pre-pre y post-posanalíticas, esto es, en la solicitud y la acción tomada a raíz del resultado de la prueba. Este laboratorio no solo interviene en la

decisión clínica, sino que también la lidera, puesto que además de GDE, realiza gestión de la demanda del defecto en la solicitud (GDD) y mediante la gestión de resultado asegura que este se haya comunicado, recibido, revisado y tomado la correcta acción (4-6). La Medicina de Laboratorio en este modelo es un servicio clave, no auxiliar o de apoyo, en el proceso global de atención al paciente (3). Este hecho refuerza su supervivencia y el apoyo de nuestros gestores a la especialidad. La *visión* del laboratorio líder, podría ser *“lograr el máximo beneficio al ciudadano, paciente y sociedad”*.

Los objetivos del sistema de gestión estarán relacionados con la mejora de la utilización de las pruebas de laboratorio mediante el diseño y establecimiento de intervenciones GD y GR. Los principales *valores* del *laboratorio líder*, además del *conocimiento*, serán la *comunicación*, el *liderazgo* y la *imaginación* creativa, siendo todas ellas claves para acercarse al clínico y diseñar las intervenciones GD y GR (7). En el *laboratorio líder*, como indicadores para la monitorización de los objetivos del SG no solo habrá de calidad analítica (como en el modelo “tradicional”) o intermedios (como en el modelo “tecnológico”) sino también indicadores finales o de resultado como pudieran ser número de pacientes diagnosticados (4,5,8-11), monitorizados (12,13) o tratados (4,5).

Tomar las riendas, actuar y hacer realidad el masivo beneficio en el paciente que se puede aportar desde la Medicina de Laboratorio tendiendo a un modelo de *laboratorio líder* es decisión nuestra. Y ese es el camino. Conviértamonos en un *laboratorio líder* y cuantifiquemos nuestros logros mediante indicadores de resultado. Si en un Departamento de Salud de un cuarto de millón de habitantes llevamos diagnosticados más de 1.500 pacientes con hiperparatiroidismo primario, diabetes, déficit de vitamina B₁₂ o de magnesio, mediante las más mínimas reglas matemáticas podríamos cuantificar el beneficio si se establecieran las intervenciones GDD en toda la población de nuestro país. Invertir en la Medicina de Laboratorio es invertir en prevención al adelantar el diagnóstico de enfermedades crónicas y mejorar su seguimiento y tratamiento. Pero para ello los profesionales de la Medicina de Laboratorio debemos creer en ello y actuar en consecuencia.

María Salinas La Casta
Hospital Universitari Sant Joan d'Alacant. Alicante

Conflictos de interés: la autora declara que no existen conflictos de interés.

Agradecimientos: la autora quiere agradecer la participación de todo el equipo del laboratorio en la consecución de este laboratorio líder.

BIBLIOGRAFÍA

1. Flores E, Leiva M, Leiva-Salinas C, Salinas M. The degree of knowledge shown by physicians in relation to the variability of laboratory test results. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:381-2. DOI: 10.1515/CCLM.2009.081
2. Salinas M, Lopez Garrigós M, Gutierrez M, Lugo J, Santo-Quiles A, Uris J. Designing a Balanced Scorecard Management System in a Clinical Laboratory in Spain. *Clin Leader Manag Rev* 2011;25:2-9.
3. Salinas M, López-Garrigós M, Uris J, Leiva-Salinas C. The clinical laboratory in the health care system: A key or a support process? *Rev Calid Asist* 2013;28(4). DOI: 10.1016/j.cali.2012.10.002
4. Salinas M, Flores E, López-Garrigós M, Leiva-Salinas M, Asencio A, Lugo J, et al. Computer-assisted interventions in the clinical laboratory process improve the diagnosis and treatment of severe vitamin B12 deficiency. *Clin Chem Lab Med* 2018;56(9):1469-75. DOI: 10.1515/cclm-2017-1116
5. Salinas M, Flores E, López-Garrigós M, Puche C, Leiva-Salinas C. Automatic laboratory interventions to unmask and treat hypomagnesemia in the Emergency Department. *Clin Biochem* 2020;75:48-52. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2019.11.009
6. Salinas M, López-Garrigós M, Asencio A, Lugo J, Gutiérrez M, Flors L, et al. Alert value reporting: A new strategy for patient safety. *Clin Biochem* 2013;46(3):245-9. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.11.010
7. Salinas M. Knowledge is not enough the Prominence of the Laboratory in Clinical Decision Making through Creative Imagination, Communication and leadership. *Journal of Hematology & Thromboembolic Diseases* 2013;1:3.
8. Salinas M, López-Garrigós M, Santo-Quiles A, Gutiérrez M, Lugo J, Lillo R, et al. Customising turnaround time indicators to requesting clinician: a 10-year study through balanced scorecard indicators. *J Clin Pathol* 2014;67:797-801. DOI: 10.1136/jclinpath-2014-202333
9. Salinas M, López-Garrigós M, Flores E, Santo-Quiles A, Gutiérrez M, Lugo J, et al. Ten years of preanalytical monitoring and control: Synthetic Balanced Score Card Indicator. *Biochemia Med (Zagreb)* 2015;25:49-56. DOI: 10.11613/BM.2015.005
10. Salinas M, López-Garrigós M, Pomares F, Lugo J, Asencio A, López-Penabad L, et al. Serum calcium (S-Ca), the forgotten test: preliminary results of an appropriateness strategy to detect primary hyperparathyroidism (pHPT). *Bone* 2013;56:73-6. DOI: 10.1016/j.bone.2013.05.011
11. Salinas M, López-Garrigós M, Flores E, Leiva-Salinas M, Lugo J, Pomares FJ, et al. Automatic laboratory-based strategy to improve the diagnosis of type 2 diabetes in primary care. *Biochem Med (Zagreb)* 2016;26:121-8. DOI: 10.11613/BM.2016.013
12. Salinas M, López-Garrigós M, Flores E, Ahumada M, Leiva-Salinas C; PRIMLAB Working Group. Laboratory intervention to improve the request of urinary albumin in primary care patients with arterial hypertension and financial implications. *Clin Biochem* 2019;69:48-51. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2019.04.012
13. Salinas M, López-Garrigós M, Flores E, Lugo J, Leiva-Salinas C; PRIMary Care-LABoratory (PRIMLAB) Working Group. Laboratory Computer-Based Interventions for Better Adherence to Guidelines in the Diagnosis and Monitoring of Type 2 Diabetes. *Diabetes Ther* 2019;10:995-1003. DOI: 10.1007/s13300-019-0600-z



Original

Estudio comparativo entre diferentes métodos para la determinación de la calprotectina fecal

Comparative study between different methods for the determination of fecal calprotectin

Rocío Cabra-Rodríguez¹, Miguel Ángel Castaño López², Ana María Serrano Mira³, Antonio León-Justel⁴, Ignacio Vázquez Rico³, Juan María Vázquez Morón³, Francisco Navarro Roldán⁵

¹UGC Centro de Salud El Cachorro. Distrito Sanitario Sevilla. Sevilla. ²UGC de Análisis Clínicos. Hospital Comarcal Infanta Elena. Huelva. ³UGC de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez. Huelva. ⁴UGC de Análisis Clínicos. Hospital Universitario de Virgen Macarena. Sevilla. ⁵Departamento de Ciencias Integradas de Biología Celular. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Huelva. Huelva

Recibido: 31/03/2020
Aceptado: 25/01/2021

Correspondencia: Rocío Cabra Rodríguez. UGC Centro de Salud Alamillo. Distrito Sanitario Sevilla. Sevilla
e-mail: rocarod@hotmail.com

Palabras clave:

Calprotectina. Método. Correlación.

RESUMEN

Introducción: la calprotectina fecal (CPF) es un marcador fiable de inflamación de la mucosa. El objetivo del presente estudio fue comparar los métodos de análisis de CPF.

Material y método: se determinó CPF en 160 muestras. El método de BÜHLMANN® ELISA se comparó con otros 4: Quantum Blue® (inmunocromatografía), IDK® ELISA, BÜHLMANN fCAL® turbo (turbidimetría) y LIAISON® CPF (quimioluminiscencia). La comparación estadística se realizó mediante estudio Passing-Bablok (PB) y coeficiente de Lin.

Resultados: para el estudio de comparación de BÜHLMANN® ELISA frente al método cromatográfico Quantum Blue®, el coeficiente de correlación de concordancia Lin fue 0,9870 (IC 95 %: 0,9822 a 0,9905) y la regresión de PB indica que no hay diferencias sistemáticas ni proporcionales. Al comparar los dos métodos ELISA, BÜHLMANN® ELISA e IDK® ELISA, el coeficiente de Lin fue 0,7988 (IC 95 %: 0,6419 a 0,8915) y el PB muestra que hay diferencias proporcionales pero no sistemáticas. El coeficiente de Lin resultante del estudio comparativo entre los métodos BÜHLMANN® ELISA y BÜHLMANN fCAL® turbo fue de 0,5696 (IC del 95: 0,4632 a 0,6599), y el PB nos indica que hay diferencias sistemáticas pero no proporcionales. Finalmente, para BÜHLMANN® ELISA y LIAISON® CPF se obtuvo un coefi-

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00015

Cabra-Rodríguez R, Castaño López MA, Serrano Mira AM, León-Justel A, Vázquez Rico I, Vázquez Morón JM, Navarro Roldán F. Estudio comparativo entre diferentes métodos para la determinación de la calprotectina fecal. Rev Med Lab 2021;2(1):3-10

ciente de Lin de 0,9740 (IC 95 %: 0,9637 a 0,9814) mientras que en el PB se observan diferencias sistemáticas y proporcionales.

Conclusiones: dadas las diferencias encontradas entre los diferentes métodos, el método BÜHLMANN® ELISA solo puede intercambiarse con el Quantum Blue® cromatográfico. Por lo tanto, se requieren más esfuerzos para lograr una estandarización de los ensayos de CPF.

Keywords:

Calprotectin. Method. Correlation.

ABSTRACT

Introduction: calprotectin (CPF) is a reliable marker of mucosal inflammation. The objective of this study was to compare CPF analysis methods.

Material and method: CPF was determined in 160 samples. The method of BÜHLMANN® ELISA was compared with another 4: Quantum Blue® (immunochromatography), IDK® ELISA, BÜHLMANN fCAL® turbo (turbidimetry) and LIAISON® CPF (chemiluminiscence). The statistical comparison was performed by Passing-Bablok study (PB) and Lin coefficient.

Results: for the comparison study of BÜHLMANN® ELISA versus the Quantum Blue chromatographic method®, the Lin match correlation coefficient was 0.9870 (CI 95 %: 0.9822 to 0.9905) and PB indicates that there are no systematic or proportional differences. When comparing the two ELISA methods, BÜHLMANN® ELISA and IDK® ELISA, Lin coefficient was 0.7988 (95 % CI: 0.6419 to 0.8915) and PB shows that there are proportional but non- systematic differences. Lin's coefficient resulting from the comparative study between the methods BÜHLMANN® ELISA and BÜHLMANN fCAL® turbo was 0.5696 (95: 0.4632 to 0.6599 IC), while with PB it tells us that there are systematic but not proportional differences. Finally, for BÜHLMANN® ELISA and LIAISON® CPF, a Lin coefficient of 0.9740 (95 % CI: 0.9637 to 0.9814) was obtained but PB indicates that it has systematic and proportional differences.

Conclusions: the differences between the different methods only made possible to interchange BÜHLMANN® ELISA with Quantum Blue® chromatographic method. Therefore, more effort is required to achieve standardization of CPF tests.

INTRODUCCIÓN

La calprotectina (CPF) es una glicoproteína de 36 kDa de la familia de las lipocalinas que transporta moléculas hidrofóbicas. Fue descrita por primera vez en 1980 por Fagerhol y cols. y se encuentra en el citoplasma de las células implicadas en el proceso inflamatorio, como son los neutrófilos (donde representa el 60 % de las proteínas de su citosol), los monocitos y los macrófagos activados (1,2).

La aparición de CPF se relaciona con la migración de neutrófilos hacia la mucosa intestinal durante el proceso inflamatorio. Esta inflamación intestinal se acompaña de migración de estas células a la luz intestinal; de este modo, la concentración de CPF es directamente proporcional al número de neutrófilos en la luz intestinal (3,4).

El método de referencia en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es la ileocolonoscopia con toma de muestras histológicas. Sin embargo, los procedimientos de endoscopia y

preparación del intestino son caros, consumen mucho tiempo y presentan molestias para el paciente por ser una técnica invasiva (4).

En los últimos años, la búsqueda de parámetros bioquímicos en plasma y heces para la detección de inflamación intestinal, ha sido todo un reto, sin embargo, la CPF se ha convertido en una herramienta de diagnóstico muy demandada en la evaluación de la actividad de la EII (5,6). En la actualidad, es considerada el mejor marcador para el diagnóstico diferencial entre la enfermedad intestinal orgánica (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn) y la enfermedad intestinal funcional (colon irritable) (4). Se eleva significativamente en enfermedad inflamatoria intestinal orgánica, mientras que, no se encuentra elevada en pacientes con enfermedad intestinal funcional (5-7).

Los niveles de CPF varían en función de la edad. La CPF se eleva significativamente en neonatos y disminuyen durante las primeras semanas hasta los 4 años, cuando los niveles ya son comparables a los de los adultos, por lo tanto, los valores de referencia fijados

para los niños mayores de 4 años son similares a los encontrados en los adultos (8,9). No existen diferencias de concentración entre sexos. No obstante, los niveles de CPF pueden mostrar variaciones notables en muestras realizadas en días consecutivos en pacientes sin enfermedad intestinal (10).

En 2014, Lin y cols. publicaron un metaanálisis en el que analizaban 13 estudios: 5 estudios basados en cuantificación de CPF mediante ELISA y el resto mediante Inmunoensayo enzimático de absorbancia para la determinación cuantitativa, diseñado por la "Calprotectin Company". Obtuvieron un punto de corte de 50 µg/g con una sensibilidad del 92 % y una especificidad del 60 %. La sensibilidad disminuía hasta un 80 % y aumentaba la especificidad hasta un 82 % cuando el punto de corte era de 250 µg/g. Dicho estudio concluía que la CPF era un marcador fiable para la evaluación de la actividad de la EII, observando una mayor precisión en colitis ulcerosa que en enfermedad de Crohn (11).

El límite superior de referencia de CPF está establecido, según la ficha técnica de las distintas casas comerciales para los diferentes métodos, en CPF de 50-100 µg/g (12,13). Sin embargo, a día de hoy, no existe un consenso en el punto de corte óptimo de CPF para establecer actividad endoscópica de la enfermedad.

La CPF se considera un marcador fiable de inflamación mucosa que se correlaciona bien con varios de los índices de actividad endoscópicos, entre los que se encuentra el SES-CD colónico (14). Asimismo, es capaz de discriminar la actividad inflamatoria valorada por endoscópica, siendo de utilidad para monitorizar la respuesta al tratamiento y predecir el riesgo de recidiva (14).

Según las recomendaciones de ECCO-ESGAR (Guideline for Diagnostic Assessment in Inflammatory Bowel Disease) (15), se puede obtener una buena precisión diagnóstica para la práctica clínica con un valor de corte de 150 µg/g, pese a no existir un valor de corte exacto. Para el seguimiento, según recoge la guía "ACG Clinical Guideline: Management of Crohn's Disease in Adults"; para monitorizar a los pacientes tras la resección ileocólica postoperatoria para la enfermedad de Crohn, los niveles de > 100 µg/g indican recurrencia endoscópica con una sensibilidad del 89 % y en pacientes con una remisión inducida por infliximab, la CPF > 160 µg/g tiene una sensibilidad del 91,7 % y una especificidad del 82,9 % para predecir la recaída (16).

Actualmente encontramos disponibles distintos métodos de medida para la cuantificación de CPF, tales como enzoinmunoanálisis (ELISA), turbidimetría, quimioluminiscencia e inmunocromatografía, sin embargo, existe una falta de estandarización en general entre los diferentes ensayos para la determinación de CPF. Los anticuerpos usados para su determinación pueden ser monoclonales o policlonales, siendo los primeros los que tienen una mayor sensibilidad y especificidad (11).

Estos métodos carecen de un patrón internacional que propicie una homogeneidad de los ensayos entre las diferentes casas comerciales (17-19).

Objetivo

El objetivo del presente estudio ha sido, comparar el método de CPF BÜHLMANN® ELISA, frente a Quantum Blue® (inmunocromatografía), IDK® ELISA, BÜHLMANN fCAL® turbo (turbidimetría) y LIAISON® CPF (quimioluminiscencia) con el fin de establecer la correlación entre el método BÜHLMANN® ELISA y los otros métodos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó la determinación de CPF en 160 muestras mediante BÜHLMANN® ELISA, Quantum Blue® (inmunocromatografía de flujo lateral), IDK® ELISA (enzoinmunoanálisis), BÜHLMANN fCAL® turbo (turbidimetría) y LIAISON® CPF (inmunoensayo quimioluminiscente).

Los pacientes con EII fueron reclutados en la consulta de la Unidad de Digestivo de nuestro hospital, informándoles del estudio y dando su consentimiento verbal a participar en el mismo. Se les facilitó un único contenedor de heces estéril para la recogida de la muestra. Una vez en el laboratorio, se procedió a realizar la extracción en sus correspondientes dispositivos según las recomendaciones del fabricante, conservándose todas las muestras a -80 °C hasta el momento de su análisis.

Para la realización de los procedimientos analíticos de las muestras de CPF se siguieron estrictamente las instrucciones de todos los fabricantes. Las muestras fueron analizadas por duplicado y durante todo el estudio se utilizó en mismo número de lote de reactivo para cada método empleado.

Se realizó un estudio comparativo siguiendo las recomendaciones descritas por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), en la guía EP09-A2-IR (20-22), que permite la evaluación y la comparación de dos métodos que midan el mismo analito, utilizando muestras de pacientes, siempre que uno de los dos sea el método de referencia o el método habitual del laboratorio (23,24).

Se estudió la reproducibilidad de los duplicados. Para cada método empleado, se calculó el promedio de las medidas por duplicado ($(x_1 + x_2)/2$) y las diferencias absolutas de estas ($DX_i = |x_1 - x_2|$). Los límites de aceptabilidad entre duplicados correspondieron al promedio de las diferencias multiplicado por 4 (24,25).

En este estudio de evaluación de métodos, se utilizó como referencia BÜHLMANN® ELISA, por ser el método habitual disponible en nuestro laboratorio y sobre el que se habían realizado estudios previos de verificación.

Métodos

Las características de los distintos métodos empleados se muestran en la tabla I. Se describen a continuación.

Tabla I.
Características principales de los diferentes métodos comparados

	Tipo de método	Anticuerpo empleado	Dispositivo de extracción	Volumen del extracto	Plataforma de trabajo	Rango de medida	Duración
BÜHLMANN® ELISA (Palex)	ELISA (sándwich)	Ac. monoclonal de captura y detección	BÜHLMANN Calex Cap® (Palex)	50-150 µl	Triturus® (Grifols)	10-1800 µg/g	2 horas
Quantum Blue® (Palex)	Inmuno-cromatografía	Ac. monoclonal	ScheBo® Quick-Prep (Palex)	60-80 µl	Quantum Blue Reader (Palex)	100-1800 µg/g y 30-100 µg/g	12-15 minutos
IDK® ELISA (Inmunodiagnostik)	ELISA (sándwich)	Ac. monoclonal de captura y detección	IDK Extract® 2,5x (Inmunodiagnostik)	50-150 µl	Triturus® (Grifols)	30-1800 µg/g	2 horas
BÜHLMANN fCAL® turbo (Palex)	Turbidimetría	Inmunopartículas Ac. policlonal de detección	BÜHLMANN Calex Cap® (Palex)	10 µl	Cobas 6000 c501 (Roche)	20 a 8.000 µg/g	10 minutos
LIAISON® CPF (Diasorin)	CLIA	Ac. monoclonal para Subunidad S100A9	CPF Stool Extraction Device (DiaSorin, LIAISON®)	5 µl	LIAISON® and LIAISON® XL	5 a 800 µg/g (8000 µg/g)	35 minutos

ELISA: enzimoimmunoanálisis; Ac: anticuerpo; CLIA: inmunoensayo quimioluminiscente; CPF: calprotectina fecal.

Método BÜHLMANN® de ELISA (Palex)

Se trata de un enzimoimmunoanálisis que permite la medición selectiva de CPF mediante un ensayo tipo sándwich. La placa de microtitulación de ELISA está recubierta con un anticuerpo de captura monoclonal (mAb) altamente específico para los complejos poliméricos y heterodiméricos de CPF.

Para este método se empleó el dispositivo de extracción BÜHLMANN Calex Cap® que consigue obtener una dilución de 1:500 con la muestra de heces (50-100 mg). Para la realización del ensayo se utilizaron de 50-150 µL de extracto obtenido.

La duración aproximada del ELISA fue de 2 horas. Para ello, se usó la plataforma Triturus® (Grifols) con un único rango de medida de 10-1800 µg/g.

Método IDK® ELISA CPF (Inmunodiagnostik)

Se trata de un enzimoimmunoanálisis tipo sándwich que emplea dos anticuerpos monoclonales que se unen a la CPF, diseñado para la cuantificación de la misma.

El extractor utilizado para el método IDK® ELISA fue IDK Extract® 2,5x (1:100) que consigue una dilución con las muestras de 1:25, empleándose para la realización del ensayo de 50-150 µL del extracto.

La duración aproximada del proceso fue de 2 horas. El ensayo se realizó de forma automatizada en la plataforma Triturus (Grifols) con un único rango de medida de 30-1800 µg/g.

Método Quantum Blue® CPF (Palex)

Se trata de un método rápido inmunocromatográfico que se basa en la determinación selectiva del antígeno de CPF mediante un inmunoanálisis tipo sándwich, en el que participa un anticuerpo monoclonal conjugado con oro coloidal.

El extractor empleado fue ScheBo® Quick-Prep que contiene 1,3 ml del tampón de extracción con una dilución 1:50. El volumen del extracto para la realización del ensayo fue 60-80 µL.

La duración de este inmunoensayo fue alrededor de los 12-15 minutos, la lectura del casete se realizó en el Quantum Blue Reader (Palex), instrumento para el análisis de pruebas colorimétricas mediante reflectometría para la obtención de resultados cuantitativos.

El método Quantum Blue® proporciona dos rangos de medidas: rango alto (100-1800 µg/g) y rango bajo (30-100 µg/g). Se utilizó para cada una de las muestras el más adecuado en función de una primera medición.

Método LIAISON® CPF (Diasorin)

Se trata de un inmunoensayo quimioluminiscente cuantitativo tipo sándwich que utiliza anticuerpos monoclonales (para Subunidad S100A9).

Se usaron los extractores específicos CPF Stool Extraction Device (DiaSorin, LIAISON®). Para la realización del ensayo se emplearon 5 µL de extracto.

Este inmunoensayo tiene una duración aproximada de 35 minutos. El ensayo se procesó de forma automatizada en la plataforma LIAISON® and LIAISON® XL y el rango de medición fue de 5 a 800 µg/g, con posibilidad de diluciones automáticas para mediciones hasta los 8000 µg/g.

Método BÜHLMANN fCAL® turbo (Palex)

Este método se basa en un inmunoanálisis turbidimétrico mejorado con partículas (PETIA). Los extractos se incubaron con tampón de reacción y se mezclaron con nanopartículas de poliestireno recubiertas de anticuerpos anticalprotectina (inmunopartículas).

Se empleó el dispositivo de extracción BÜHLMANN Calex Cap®, con una dilución del extracto de 1:500. Fueron necesarios para la realización del ensayo 10 µL del extracto.

La duración del procedimiento fue de aproximadamente de 10 minutos. Las muestras fueron procesadas en la plataforma cobas 6000 c501 (Roche) con un rango de medición de 20 a 8.000 µg/g.

Análisis estadístico

Para las comparaciones de ELISA BÜHLMANN (Palex) respecto a cada uno de los otros métodos estudiados se realizó un estudio de PB y se calculó el coeficiente de correlación de Lin, como índice de acuerdo absoluto.

Para el PB y la generación de gráficos se utilizó el Software R versión 2.12.2, junto con la interfaz R-comman-

der, proyecto R de la Universidad de Cádiz y el software Medcalc® versión 11.0.

El coeficiente de correlación de concordancia de Lin se calculó con el software Medcalc®. Las medidas resultantes por debajo del límite de cuantificación (LoQ) de alguno de los 5 métodos quedaron excluidas del análisis estadístico.

RESULTADOS

De las 160 muestras procesadas, se excluyeron 11 debido al distinto LoQ para dichos métodos, en los que se fijaba un punto de corte determinado.

Los resultados obtenidos del coeficiente de correlación de concordancia de Lin, los valores de la ordenada en origen y la pendiente del método de regresión de PB y sus correspondientes intervalos de confianza se muestran en la tabla II y la figura 1.

Observamos en nuestro estudio, de forma general, tres valores *outliers*, que no se pudieron eliminar siguiendo los criterios de REED (25,26).

Con el método BÜHLMANN® ELISA y Quantum Blue® obtuvimos un coeficiente de correlación de concordancia Lin de 0,9870 (IC 95 %: 0,9822 a 0,9905). Con el método de regresión de PB no se observaron diferencias sistemáticas o proporcionales entre los dos métodos.

Para los dos métodos de ELISA, BÜHLMANN® ELISA e IDK® ELISA, el coeficiente de correlación de concordancia de Lin fue 0,7988 (IC 95 %: 0,6419 a 0,8915). El método de PB mostró que existían diferencias proporcionales entre los dos métodos, al no incluir el 1 el intervalo de confianza de la pendiente.

Tabla II.
Resultados del estudio comparativo de BÜHLMANN® ELISA con otros 4 métodos para la medición de CPF

	Passing- Bablok (n = 149)		Coefficiente de correlación de concordancia Lin (n = 149)	Rango	Mediana
Método de comparación con BÜHLMANN® ELISA	Ordenada en el origen (IC 95 %)	Pendiente (IC 95 %)	Coefficiente Lin (IC 95 %)	µg/g	µg/g
BÜHLMANN® ELISA				11-7662	485
Quantum Blue® (cromatografía)	-6,5316 (-14,2945 a 6,4897)	0,9790 (0,9040 a 1,0136)	0,9870 (0,9822 a 0,9905)	30-7566	480
IDK® ELISA	13,9033 (-8,1436 a 36,234)	1,2547 (1,1293 a 1,7174)	0,7988 (0,6419 a 0,8915)	9,3-1800	133
BÜHLMANN fCAL® turbo (turbidimetría)	-49,3734 (-58,722 a -41,301)	1,0563 (0,9825 a 1,1242)	0,5696 (0,4632 a 0,6599)	11-1438	91,6
LIAISON® CPF (quimioluminiscencia)	-11,0232 (-16,645 a -0,2022)	0,4512 (0,3370 a 0,5462)	0,9740 (0,9637 a 0,9814)	5-1800	590

n: número de muestras; IC: intervalo de confianza; rango: rango de las muestras estudiadas por este método.

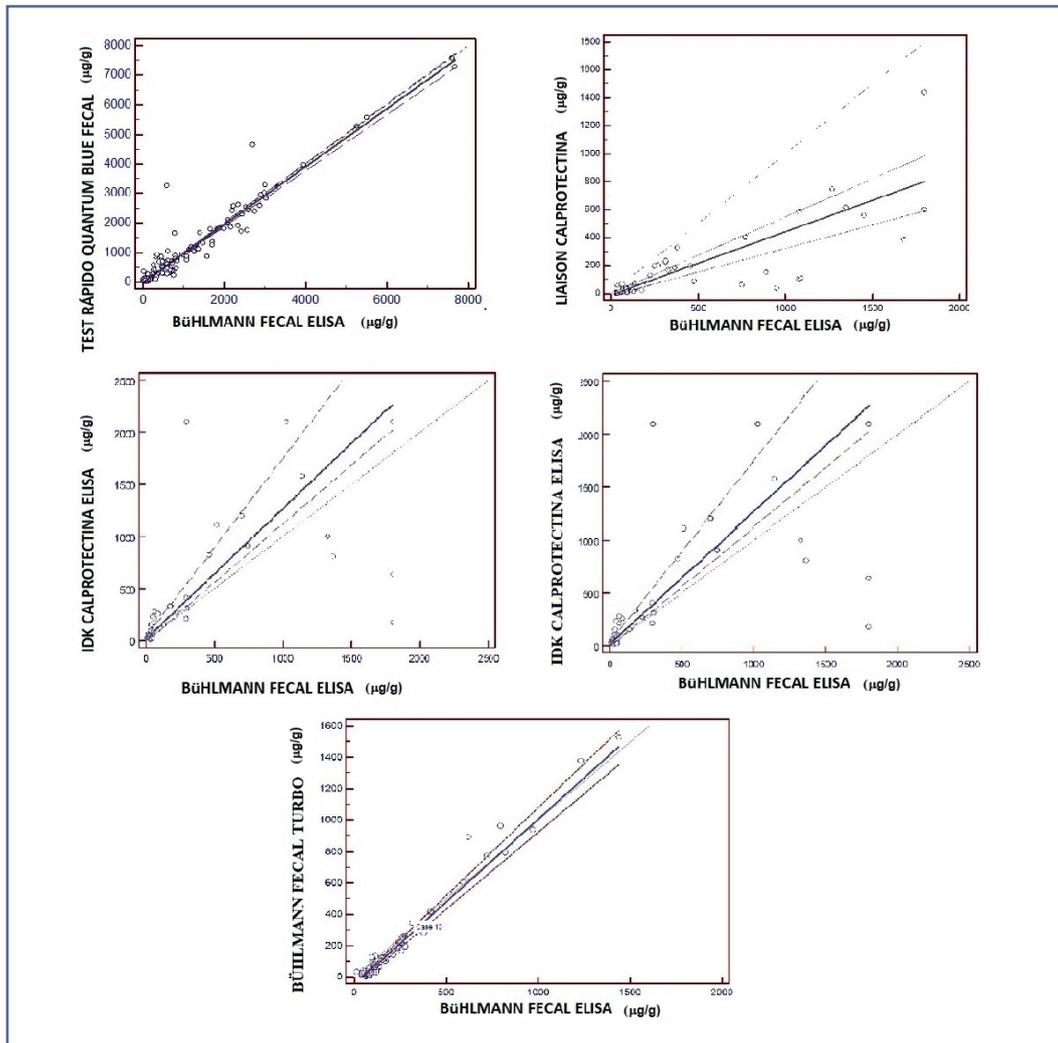


Figura 1 – Regresión de Passing-Bablok de los diferentes métodos de CPF analizados.

Para el estudio comparativo entre el método BÜHLMANN® ELISA y BÜHLMANN fCAL® turbo se obtuvo un coeficiente de correlación de concordancia de Lin de 0,5696 (IC del 95 %: 0,4632 a 0,6599). El método de PB demostró una diferencia sistemática entre los dos métodos, ya que el intervalo de confianza de la ordenada en origen no incluía el 0.

Finalmente, se obtuvo un coeficiente de correlación de concordancia de Lin de 0,9740 (IC del 95 %: 0,9637 a 0,9814) para BÜHLMANN® ELISA y LIAISON® CPF. Sin embargo, el método de PB indicaba que había una diferencia sistemática y proporcional entre los dos métodos, ya que el intervalo de confianza de la ordenada en el origen no incluía el 0, ni el intervalo de confianza de la pendiente el 1.

Por tanto, los coeficientes de Lin de las distintas comparaciones detectaron un grado de concordancia (0,95-0,99) entre BÜHLMANN® ELISA con Quantum Blue® y LIAISON® CPF, sin embargo, el grado de concordancia, de BÜHLMANN® ELISA con BÜHLMANN fCAL® turbo e IDK® ELISA fue pobre (< 0,90).

DISCUSIÓN

La CPF es un marcador biológico que podemos medir en el laboratorio de forma rutinaria, siendo de gran importancia en el diagnóstico, seguimiento y la toma de decisiones en pacientes con EII (27,28).

Para el diagnóstico diferencial de la EII y pese a que no hay consenso en el punto de corte, la recomendaciones del Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (GETECCU) sobre la utilidad de la determinación de CPF en la EII, propone que valores de CPF < 50-100 µg/g hacen muy improbable la presencia de inflamación intestinal y permitirían obviar colonoscopias diagnósticas (29).

Con nuestros resultados podemos concluir que el método Quantum Blue® fue el que mostró mayor grado de concordancia con el método BÜHLMANN® ELISA para la determinación de CPF (coeficiente de Lin de 0,9870) y ambos métodos pueden ser intercambiables ya que no se observan diferencias sistemáticas ni proporcionales entre ellos.

El Quantum Blue® es un test rápido, que puede emplearse como “test a la cabecera del paciente”, ya que realiza cada análisis de forma individualizada en 12-15 minutos. Esto permite obtener resultados sin necesidad de acumular muestras para la realización del estudio, como ocurre con los ELISA, por lo que es una opción válida para laboratorios con poco volumen de muestras o departamentos clínicos en los se necesita dar una respuesta rápida para el seguimiento del paciente (27,28).

Los métodos de CPF BÜHLMANN® ELISA y IDK® ELISA se basan en un mismo tipo de ensayo, por lo que esperábamos que existiera una buena correlación entre ellos. Sin embargo observamos un grado de concordancia pobre, lo que está en línea con lo encontrado en el estudio del Servicio Nacional de Evaluación de Calidad Externa del Reino Unido, que reveló diferencias de hasta 3,8 veces entre ELISA de diferentes fabricantes (30).

BÜHLMANN® ELISA y BÜHLMANN fCAL® turbo pertenecen a una misma casa comercial (Palex), al igual que Quantum Blue®, por lo que esperábamos encontrar una buena correlación también con estos dos métodos, máxime cuando BÜHLMANN® ELISA y BÜHLMANN fCAL® turbo emplean un mismo dispositivo de extracción. Sin embargo, la comparación de BÜHLMANN® ELISA con BÜHLMANN fCAL® turbo fue la que mostró un menor coeficiente de Lin (0,5696), por lo que no son intercambiables.

El método LIAISON® CPF presentó siempre valores absolutos más bajos que BÜHLMANN® ELISA, esto puede ser debido a que la metodología empleada es distinta y a que cada método emplea un extractor específico y diferente en su composición.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio coinciden con el estudio de Labaere y cols., donde tras evaluar la correlación cuantitativa entre 6 métodos de CPF, mostraron coeficientes de correlación de moderados a excelentes, sin embargo, al realizar el análisis de regresión, observaron diferencias significativas (hasta 5 veces) (4). Las diferencias encontradas en nuestro trabajo entre los distintos métodos pueden ser debidas no solo a la diferente metodología, sino también a la fase preanalítica. Los distintos extractores de cada casa comercial tienen composiciones diferentes que desconocemos, diferentes protocolos de extracción, y los métodos emplean distinto volumen de extracto (Tabla I), circunstancias que pueden repercutir directamente en los resultados de nuestro estudio.

CONCLUSIONES

Actualmente, existen comercializados una amplia variedad de métodos para la determinación de CPF. Cada método difiere en su forma de procesamiento, ensayo y condiciones de almacenamiento y usa extractores diferentes, de los que se desconoce su composición.

Como se demuestra con los resultados obtenidos de nuestro estudio, solo puede intercambiarse con BÜHL-

MANN® ELISA el método Quantum Blue®. Se requieren más esfuerzos para conseguir una estandarización global de los ensayos de CPF, ya que las guías y recomendaciones hacen referencia a los mismos valores de referencia, independientemente del ensayo utilizado para su determinación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:661-5. DOI: 10.1097/00054725-200409000-00026
2. Bjerke K, Halstensen TS, Jahnsen F, Pulford K, Brandtzaeg P. Distribution of macrophages and granulocytes expressing L1 protein (calprotectin) in human 69 Peyer's patches compared with normal ileal lamina propria and mesenteric lymph nodes. *Gut* 1993;34:1357-63. DOI: 10.1136/gut.34.10.1357
3. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 2006;55:426-31. DOI: 10.1136/gut.2005.069476
4. Labaere D, Smismans A, Van Olmen A, Christiaens P, D'Haens G, Moons V, et al. Comparison of six different calprotectin assays for the assessment of inflammatory bowel disease. *United European Gastroenterol J* 2014;2:30-7. DOI: 10.1177/2050640613518201
5. López-Victoria AB, Noffal-Nuño VM. Biomarcadores tradicionales y novedosos en el diagnóstico de Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Med Sur* 2013;20(1):21-5.
6. Angulo MEL, de las Heras Gómez I, Villanueva MM, Velasco JAN, Plaza FA. Calprotectina fecal, marcador eficaz en la diferenciación de enfermedades inflamatorias intestinales y trastornos funcionales gastrointestinales. *Gastroenterol Hepatol* 2017;40:125-31. DOI: 10.1016/j.gastre.2017.02.002
7. Bjarnason I. The Use of Fecal Calprotectin in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol* 2017;13:53.
8. Rodríguez-Moranta F, Lobatón T, Rodríguez-Alonso L, Guardiola J. Calprotectina fecal en el diagnóstico de enfermedades inflamatorias. *Gastroenterol Hepatol* 2013;36:400-6. DOI: 10.1016/j.gastrohep.2012.10.008
9. Olafsdottir E, Aksnes L, Fluge G, Berstad A. Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. *Acta Paediatr* 2002;91:45-50. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2002.tb01638.x
10. Malickova K, Janatkova I, Bortlik M, Komarek V, Lukas M. Calprotectin levels in patients with idiopathic inflammatory bowel disease comparison of two commercial Tests. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2008;57:147-53.
11. Lin JF, Cen JM, Zuo JH, Yu A, Xiao ZJ, Deng FH, et al. Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:1407-15. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000057
12. Gecse KB, Brandse JF, Van Wilpe S, Löwenberg M, Ponsioen C, Van den Brink G, et al. Impact of disease location on fecal calprotectin levels in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2015;50:841-7. DOI: 10.3109/00365521.2015.1008035
13. Yamamoto-Furusho JK. Enfermedad de Crohn: Diagnóstico y tratamiento. *Revista de Gastroenterología de México* 2013;78:68-70. DOI: 10.1016/j.rgmx.2013.06.010
14. Schoepfer A, Beglinger C, Straumann A, et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:162-9. DOI: 10.1038/ajg.2009.545

15. Maaser C, Sturm A, Vavricka SR, Kucharzik T, Fiorino G, Annese, V, et al. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD. Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *J Crohns Colitis* 2019;13(2):144-164K. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjy113
16. Lichtenstein GR, Loftus EV, Isaacs KL, Regueiro MD, Gerson LB, Sands BE. ACG clinical guideline: management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* 2018;113(4):481-517. DOI: 10.1038/ajg.2018.27
17. Kittanakom S, Shajib MS, Garvie K, Turner J, Brooks D, Odeh S, ET AL. Comparison of Fecal Calprotectin Methods for Predicting Relapse of Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2017;2017:1450970 DOI: 10.1155/2017/1450970
18. Lobatón T, Rodríguez-Moranta F, Lopez A, Sánchez E, Rodríguez-Alonso L, Guardiola JA. New rapid quantitative test for fecal calprotectin predicts endoscopic activity in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:1034-42. DOI: 10.1097/MIB.0b013e3182802b6e
19. Damms A, Bischoff SC. Validation and clinical significance of a new calprotectin rapid test for the diagnosis of gastrointestinal diseases. *Int J Colorectal Dis* 2008;23:985-92. DOI: 10.1007/s00384-008-0506-0
20. Delefortrie Q, Schatt P, Grimmelprez A, Gohy P, Deltour D, Collard G, et al. Comparison of the Liaison® Calprotectin kit with a well established point of care test (Quantum Blue—Bühlmann-Alere®) in terms of analytical performances and ability to detect relapses amongst a Crohn population in follow-up. *Clin Biochem* 2016;49:268-73. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2015.10.010
21. Rodriguez A, Yokomizo L, Christofferson M, Barnes D, Khavari N, Park KT. Correlation of rapid point-of-care vs send-out fecal calprotectin monitoring in pediatric inflammatory bowel disease. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2017;8:127. DOI: 10.4292/wjgpt.v8.i2.127
22. Clinical And Laboratory Standards Institute Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. 2nd ed. EP09-A2-IR 2010;30(17).
23. Krouwer JS, Tholen DW, Garber CC, Goldschmidt HM, Kroll MH, Linnet K, et al. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—2nd ed. NCCLS document EP9-A2. Pennsylvania, USA; 2002.
24. Schulz C, Wex T, Arnim UV, Malfertheiner P. Validation of Two Calprotectin Rapid Tests in Daily Routine. *Clinical Laboratory* 2016;62:1249. DOI: 10.7754/clin.lab.2015.151101
25. Canalias RF. Recomendaciones para el estudio de la precisión de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. *Química Clínica* 2003;22:63-5.
26. Prieto L, Lamarca R, Casado A. La evaluación de la fiabilidad en las observaciones clínicas: el coeficiente de correlación intraclase. *Med Clin (Bar)* 1998;110:142-5.
27. Oyaert M, Trouvé C, Baert F, De Smet D, Langlois M, Vanpoucke H. Comparison of two immunoassays for measurement of faecal calprotectin in detection of inflammatory bowel disease: (pre)-analytical and diagnostic performance characteristics. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:391-7. DOI: 10.1515/cclm-2013-0699
28. Abej E, El-Matary W, Singh H, Bernstein CN. The utility of fecal calprotectin in the real-world clinical Care of Patients with inflammatory bowel disease. *Canadian J Gastroenterol Hepatol* 2016;2016:2483261. DOI: 10.1155/2016/2483261
29. Guardiola J, Lobatón T, Cerrillo E, Ferreiro-Iglesias R, Gisbert JP, Domènech, et al. Recomendaciones del Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (GETECCU) sobre la utilidad de la determinación de calprotectina fecal en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol* 2018;41(8):514-29. DOI: 10.1016/j.gastrohep.2018.05.029
30. Whitehead S, French J, Brookes M, Ford C, Gama R. Between-assay variability of faecal calprotectin enzyme-linked immunosorbent assay kits. *Ann Clin Biochem* 2013;50:53-61. DOI: 10.1177/2050640613518201



Original

Rangos de referencia de cadenas ligeras libres en suero de Trimer Diagnostic por turbidimetría. ¿Pueden ser universales los puntos de corte?

Serum free light chains reference ranges from Trimer Diagnostic by turbidimetry. Are the guidelines' cut-offs universal?

Luis J. Morales-García¹, María S. Pacheco-Delgado¹

Servicio de Laboratorio Clínico. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Fuenlabrada, Madrid

Recibido: 11/12/2020
Aceptado: 25/03/2021

Correspondencia: Luis J. Morales-García. Servicio de Laboratorio Clínico. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Camino del Molino, 2. 28942 Fuenlabrada, Madrid
e-mail: luisjavier.morales@salud.madrid.org

Palabras clave:

Rango de referencia. Intervalo de referencia. Mieloma múltiple. Cadenas ligeras libres de suero. Gammapatía monoclonal.

RESUMEN

Introducción: el análisis de cadenas ligeras libres en suero (CLL) se ha incorporado a las guías del International Myeloma Working Group para el diagnóstico y tratamiento de las gammapatías monoclonales. Estas recomendaciones se basaron únicamente en un único ensayo (Freelite) e instrumento. Aquí establecemos nuevos rangos de referencia (RR) para CLL kappa y lambda, para la diferencia y la suma kappa-lambda y un nuevo rango de diagnóstico para la ratio kappa/lambda de CLL (K/L-CLL) en un AU5800 (Beckman Coulter) con el reactivo de Trimer Diagnostic.

Material y métodos: para establecer nuevos RR se aplicó el protocolo CLSI EP28-A3C a 247 muestras de donantes de Fuenlabrada (Madrid, España) y se obtuvo la estimación del 95 % central y rango total. Se utilizaron muestras de pacientes con hipo e hipergammaglobulinemia policlonal para la evaluación de K/L-CLL como índice de proliferación monoclonal.

Resultados: los nuevos RR y el nuevo rango de diagnóstico de K/L-CLL para Trimer (0,44-1,23 mg/L) son muy diferentes a los de las guías (0,26-1,65 mg/L). Proponemos nuevos RR para la diferencia K-L y la suma K+L.

Agradecimientos: agradecemos a Trimer Diagnostic por la provisión de los reactivos y el soporte técnico.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00061

Morales-García LJ, Pacheco-Delgado MS. Rangos de referencia de cadenas ligeras libres en suero de Trimer Diagnostic por turbidimetría. ¿Pueden ser universales los puntos de corte?. Rev Med Lab 2021;2(1):11-20

La validación del rango diagnóstico como índice de proliferación monoclonal con muestras con hipo- e hipergammaglobulinemia confirman este nuevo rango.

Conclusiones: en este estudio presentamos RR de CLL para reactivo de Trimerio medidos en un AU5800. Estos rangos son diferentes a los proporcionados por el fabricante y a los utilizados en la mayoría de los estudios y pueden conducir a una clasificación errónea de los pacientes. Los fabricantes y los laboratorios clínicos deben esforzarse por proporcionar RR.

Keywords:

Reference range. Reference interval.
Multiple myeloma. Serum free light chain.
Monoclonal gammopathy.

ABSTRACT

Background: serum free light chain (FLC) analysis has been incorporated into the International Myeloma Working Group guidelines for diagnosis and management of monoclonal gammopathies. These recommendations were solely based on a single assay method (Freelite) and instrument. Here we establish new reference ranges (RR) for kappa and lambda FLC, for kappa-lambda difference and sum and new diagnostic range for kappa/lambda FLC ratio (K/L-FLC) in a AU5800 (Beckman Coulter) with the Trimerio Diagnostic assay.

Material and methods: to establish new RRs the CLSI EP28-A3C protocol was applied to 247 samples blood donors from Fuenlabrada, Spain and the estimation of central 95 % and total range was obtained. Samples from patients with polyclonal hypo- and hypergammaglobulinemia were used for the evaluation of K/L-FLC as a monoclonal proliferation index.

Results: the new RRs and the new K/L-FLC diagnostic range for Optilite (0.44-1.23 mg/L) are very different to the ones on the guidelines (0.26-1.65 mg/L). We propose new RRs for K-L difference and K+L sum. Diagnostic range validation as monoclonal proliferation index with samples with hypo and hypergammaglobulinemia confirm this new range.

Conclusions: in this study we present FLC RRs for Trimerio reagents measured on a AU5800. These ranges are different from those provided by the manufacturer and from those used in most studies in the literature and these may lead to misclassification of patients. Manufacturers and clinical laboratories must strive to provide RRs for the technology they are using and for their population.

INTRODUCCIÓN

Las cadenas ligeras libres (CLL) de inmunoglobulinas se producen normalmente en un ligero exceso por las células B para proporcionar el ensamblaje correcto de inmunoglobulinas intactas. Sin embargo, solo el 60 % de las CLL se ensamblan correctamente en inmunoglobulinas recién sintetizadas, mientras que el resto se libera en la circulación sanguínea dando lugar al conjunto de CLL policlonales en suero. El exceso se elimina por la acción catabólica de las enzimas en los túbulos proximales del riñón.

En condiciones fisiológicas se producen diariamente aproximadamente 500 mg de CLL en suero (sCLL), con una vida media que varía de 2 a 6 horas. En consecuencia, dado que las concentraciones de sCLL dependen tanto de su producción como del aclaramiento renal, cualquier exceso de producción o insuficiencia renal puede contribuir a un cambio en la concentración normal de sCLL, dando lugar a concentraciones anormales de sCLL (1).

La introducción de ensayos automatizados de sCLL, que por primera vez permitió la cuantificación de sCLL en los laboratorios y la evaluación de la relación kappa/lambda de cadenas ligeras libres (K/L-CLL), cambió radicalmente el diagnóstico y la monitorización del trastorno plasmocelular.

Numerosas guías de práctica clínica incluyen las CLL tipo kappa (K-CLL) y CLL tipo lambda (L-CLL) y el ratio K/L-CLL como criterios diagnósticos y pronósticos de pacientes con gammopatías monoclonales y como respuesta al tratamiento (2,3). El grupo de trabajo internacional sobre mieloma -The International Myeloma Working Group (IMWG)- añadió estos nuevos criterios diagnósticos de laboratorio a los ya conocidos de hipercalcemia, disfunción renal, anemia y lesiones de destrucción ósea (CRAB). Estos criterios se denominaron eventos definitorios de mieloma -*myeloma defining events (MDE)*- y ahora se consideran suficientes para el diagnóstico de mieloma múltiple (MM) con o sin la presencia de criterios CRAB. Específicamente,

las sCLL constituyen un MDE cuando la ratio de CLL involucrada/no involucrada (i/u-CLL) excede de 100. Estas guías especifican que los valores propuestos se definen para las mediciones realizadas con el reactivo Freelite -The Binding Site (TBS), Birmingham, UK-, pero no indica nada sobre la tecnología utilizada ni la plataforma que se utilizó. Esos valores están basados en un estudio de Katzmann y cols. (4) en el que se definieron los rangos de referencia (RR) para valores de K-CLL y L-CLL en suero y rangos de diagnóstico para valores de K/L-CLL. Este estudio utilizó reactivos Freelite compuestos por antisueros policlonales para reconocer epítomos localizados en el dominio constante de K-CLL y L-CLL en suero. Las pruebas se realizaron en un nefelómetro BNII (Dade Behring, actualmente Siemens Healthineers). Los rangos definidos por Katzmann y cols. en este estudio son los que se citan en las guías de práctica clínica (2,3).

En los últimos años, las mediciones de K-CLL y L-CLL se han expandido a numerosas plataformas de instrumentos de varios fabricantes que utilizan metodologías nefelométricas (5) o turbidimétricas (6,7) y se ha aumentado la accesibilidad de estas pruebas en laboratorios clínicos. Otros fabricantes han lanzado sus propios reactivos para diferentes plataformas Siemens Healthineers (nefelometría) (8), Diazyme (turbidimetría) (9), Sebia (ELISA) (10), Seralite (flujo lateral) (11), Trimer Diagnostic (turbidimetría y nefelometría).

Tras la inclusión de la medición de las sCLL a los criterios de diagnóstico y respuesta al tratamiento, las sCLL se han introducido rápidamente tanto en la práctica clínica como en los ensayos clínicos. Por lo tanto, es vital que los laboratorios verifiquen o establezcan RR para K-CLL, L-CLL y rangos de diagnóstico para K/L-CLL para garantizar que la prueba satisfaga las necesidades clínicas.

Los reactivos de Trimer Diagnostic son los de más reciente aparición y no existen datos publicados de RR y de transferencia de resultados con otros reactivos. Debido a un cambio de tecnología en nuestro laboratorio, se realizó un estudio de transferibilidad de resultados y se detectó una falta de concordancia en los valores obtenidos con respecto a los de la bibliografía que podría afectar a la práctica clínica. El objetivo de este estudio es obtener RR para K-CLL, L-CLL y rangos de diagnóstico para K/L-CLL en nuestra población con los reactivos de Trimer Diagnostic en el analizador A5800 (Beckman Coulter). Como aportación original nos planteamos calcular los RR de la diferencia K-L y la suma K+L, que podrían ayudar en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Se realizó un estudio prospectivo con población sana para la obtención de RR de CLL. Durante los meses de octubre a diciembre de 2019 se recolectaron sueros de

255 donantes en el Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid (España). Antes de la aceptación en la participación en el estudio se les realizó una encuesta de salud para confirmar su estado. Los criterios de exclusión fueron aquellos que hacen que se eleven las CLL, como haber padecido alguna infección reciente, enfermedad renal crónica (ERC), enfermedades hematólogicas, enfermedades autoinmunes o diabetes *mellitus*.

A todos los participantes se les midieron proteínas totales, albúmina, creatinina, cistatina C, inmunoglobulinas, electroforesis de proteínas e inmunotipado, y se calculó la estimación del filtrado glomerular (eFG, por la fórmula CKD EPI [12] de 2012 que incluye creatinina y cistatina C), para identificar cualquier anomalía que pudiera excluir alguna muestra. Se excluyeron 6 casos por detectarse componentes monoclonales (3 IgG, 2 IgM y 1 CLL tipo lambda) y dos *outliers*, una con CLL anormalmente altas y otra con CLL anormalmente bajas. El número total de muestras seleccionadas fue 247, 147 hombres (60 %) y 100 mujeres (40 %). La mediana de edad fue de 41 años con un rango de 18-65.

Para la validación de K/L-CLL como índice de proliferación monoclonal, se analizaron sueros de 30 pacientes con hipogammaglobulinemia policlonal y de 30 pacientes con hipergammaglobulinemia policlonal. En todos estos casos, la eFG fue > 70 mL/min/1,73 m², el patrón de electroforesis de proteínas fue normal y el inmunotipado fue negativo.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética local y todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

Procesamiento y almacenamiento de muestras de suero

Las muestras de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, seguido de centrifugación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sueros se dividieron en alícuotas en dos tubos sin aditivos y se almacenaron a -40 °C hasta el análisis.

Métodos analíticos

Las pruebas bioquímicas fueron medidas en un analizador AU5800 (Beckman Coulter). Las características de las técnicas se presentan en la tabla I. La electroforesis de proteínas y el inmunotipado fueron realizados por electroforesis capilar en un instrumento V8 Nexus (Helena Laboratories) con un límite de detección de 1 mg/L para proteínas monoclonales dependiendo de la posición de la proteína monoclonal.

Las CLL se midieron por turbidimetría en el analizador AU5800 usando reactivos de Trimer Diagnostic (Barcelona, España). Este reactivo está compuesto por anticuerpos policlonales de conejo específicos contra

Tabla I.
Características de rendimiento analítico y datos de pruebas medidas en donantes de sangre

	Mediana	Intervalo intercuartil	Método de medida	CV intraensayo (%)*	CV interensayo (%)*
Proteínas totales	7,3	0,5	Biuret	< 0,34	< 0,7
Albúmina	4,4	0,4	Verde bromocresol	< 1,17	< 1,55
Cistatina C	0,77	0,16	Inmunoturbidimétrico	< 0,82	< 1,78
Creatinina	0,82	0,22	Enzimático (IDMS)	< 1,2	< 2,3
eFG CreaCis	106,2	18,0	CKD-EPI 2012		
IgG	1078	276	Inmunoturbidimétrico	< 2,24	< 4,66
IgA	234	117	Inmunoturbidimétrico	< 2,18	< 4,01
IgM	104	62	Inmunoturbidimétrico	< 2,19	< 4,08
K-CLL	8,5	2,6	Inmunoturbidimétrico	< 7,6	< 3,8
L-CLL	11,7	4,15	Inmunoturbidimétrico	< 6,5	< 4,3

*Proporcionado por el fabricante. Unidades: g/dL: proteínas totales, albúmina; mg/dL: cistatina C, creatinina, IgG, IgA, IgM; mg/L: K-CLL, L-CLL; mL/min/1,73 m²: eFG CreaCis.

los determinantes ocultos de las cadenas ligeras. El fabricante propone para sus calibradores tres trazabilidades diferentes ya que no existe un estándar internacional. Una es referida a los calibradores de Freelite; otra asignando un valor de 100 unidades arbitrarias (UA)/mL tanto a K-CLL como a L-CLL al calibrador internacional de proteínas ERM-DA470k/IFCC; y una tercera mediante la asignación de valores de K-CLL y L-CLL en mg/L al calibrador ERM-DA470k/IFCC. Los factores de conversión para pasar de Freelite (mg/L) a UA/mL son 14,62 para K-CLL y 9,41 para L-CLL, y para pasar de Freelite (mg/L) a los valores referidos al estándar ERM-DA470k/IFCC (mg/L) son 0,4275 para K-CLL y 0,1128 para L-CLL. En nuestro estudio hemos utilizado la referida a Freelite para poder comparar con otros estudios de la literatura. Se usó un solo lote de reactivos para cada prueba.

Análisis estadístico

Los RR se determinaron por el método no paramétrico de acuerdo con la guía EP28-A3C del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (13). Los percentiles 2,5 y 97,5 se usaron como límites inferior y superior. El análisis estadístico se realizó con MedCalc v.15.8 (MedCalc Software, Bélgica). Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes para las comparaciones realizadas en la validación del rango diagnóstico de K/L-CLL y las referidas a sexo y edad. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Teniendo en cuenta que la función renal del individuo puede afectar al aclaramiento de las CLL del suero se realizó una evaluación de la estimación de la función renal mediante la fórmula CKD EPI que incluye cistatina C y creatinina. Ningún individuo padecía ERC y todas las estimaciones estuvieron por encima de 70 mL/min/1,73 m². Se evidenció una disminución de la eFG con la edad y diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,016$) entre hombres (mediana: 105,0 mL/min/1,73 m²) y mujeres (mediana: 108,5 mL/min/1,73 m²). También se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) respecto al sexo para cistatina C (medianas hombres vs. mujeres: 0,79 vs. 0,72 mg/L) y creatinina (medianas hombres vs. mujeres: 0,91 vs. 0,70).

Según se muestra en el gráfico (Fig. 1), en los resultados de K/L-CLL y de la diferencia K-L-CLL no se observan grandes diferencias con la edad, sin embargo, sí se observa una leve tendencia a disminuir. Respecto del sexo, las diferencias no son estadísticamente significativas (diferencia medianas = 0,01 mg/L y 0,45 mg/L; $p = 0,84$ y $0,26$, respectivamente). Sin embargo, para K-CLL, L-CLL y la suma K+L si parece haber un aumento con la edad y diferencias estadísticamente significativas con el sexo: K-CLL (diferencia medianas = 0,7 mg/L; $p = 0,009$), L-CLL (diferencia medianas = 0,95 mg/L; $p = 0,03$), suma K+L-CLL (diferencia medianas = 1,30 mg/L; $p = 0,013$). Los resultados de CLL y su relación con la edad y el sexo se muestran en la tabla II.

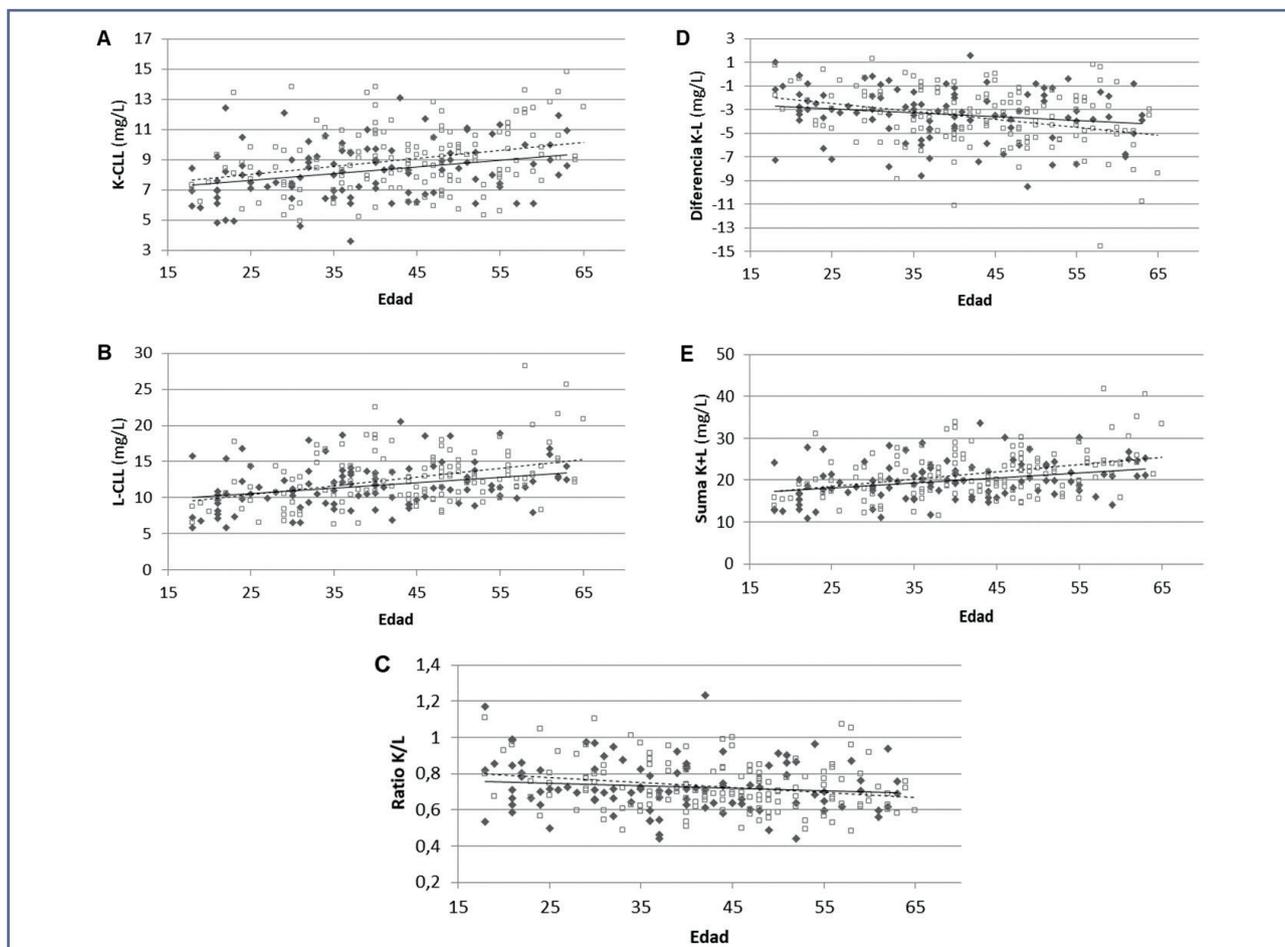


Figura 1 – Concentración de K-CLL (A), L-CLL (B), K/L-CLL (C), diferencia K-L (D) y suma K+L (E) en las 247 muestras de referencia representadas frente a la edad (años) y por sexo (K: kappa, L: lambda, CLL: cadenas ligeras libres).

◆ Mujer, □ Hombre. Línea de tendencia: — Mujer; ---- Hombre.

Tabla II.						
Valores de cadenas ligeras libres de 247 muestras de suero de donantes y su relación con la edad y el sexo						
		Media (DE)	Mediana (RI)	Percentiles 2,5-97,5	Rango	p
Edad (años) ≤ 40 n: 120 > 40 n: 127	K ≤ 40	8,3 (2,0)	8,1 (2,5)	4,8-13,4	3,6-13,8	0,0023
	K > 40	9,0 (2,0)	8,9 (2,8)	5,7-13,4	5,3-14,8	
	L ≤ 40	11,4 (3,3)	11,0 (4,1)	6,3-18,7	5,8-22,5	0,0002
	L > 40	13,0 (3,4)	12,5 (4,1)	8,0-21,5	6,9-28,2	
	K/L ≤ 40	0,75 (0,15)	0,71 (0,18)	0,49-1,10	0,44-1,17	0,0284
	K/L > 40	0,71 (0,13)	0,69 (0,16)	0,49-1,04	0,44-1,23	
	Dif K-L ≤ 40	-3,12 (2,25)	-3,0 (3,1)	-8,58-0,69	-11,1-1,3	0,0034
	Dif K-L > 40	-3,96 (2,41)	-3,8 (3,1)	-9,28-0,48	-14,6-1,6	
	Sum K+L ≤ 40	19,7 (5,0)	19,1 (7,0)	11,6-32,1	10,8-33,9	0,0003
	Sum K+L > 40	22,1 (5,1)	21,5 (6,1)	14,7-34,8	14,1-41,8	

(Continúa en la página siguiente)

Tabla II (Cont.)
Valores de cadenas ligeras libres de 247 muestras de suero de donantes y su relación con la edad y el sexo

Sexo H: n = 147 M: n = 100	K-H	9,0 (2,1)	8,9 (3,0)	5,3-13,7	4,9-14,8	0,0089
	K-M	8,2 (1,8)	8,2 (2,5)	4,7-12,2	3,6-13,1	
	L-H	12,7 (3,6)	12,2 (4,1)	6,6-21,9	6,3-28,2	0,0279
	L-M	11,6 (3,1)	11,2 (3,9)	6,3-18,8	5,8-20,5	
	K/L-H	0,73 (0,14)	0,70 (0,17)	0,50-1,06	0,48-1,11	0,8425
	K/L-M	0,73 (0,15)	0,71 (0,19)	0,45-1,07	0,44-1,23	
	Dif K-L-H	-3,7 (2,4)	-3,6 (3,1)	-9,5-0,6	-14,6-1,3	0,2587
	Dif K-L-M	-3,4 (2,2)	-3,1 (2,8)	-8,2-0,4	-9,5-1,6	
	Suma K+L-H	21,6 (5,4)	21,0 (6,4)	12,6-34,3	11,6-41,8	0,0126
	Suma K+L-M	19,8 (4,6)	19,7 (5,9)	11,5-30,2	10,8-33,6	

Unidades: mg/L. DE: desviación estándar. RI: rango intercuartil. p: significación estadística. K: kappa CLL. L: lambda CLL. K/L: ratio kappa/lambda CLL. Dif K-L: diferencia CLL kappa-lambda. Suma K+L: suma CLL kappa+lambda. H: hombres. M: mujeres.

Se establecieron los percentiles 2,5 y 97,5 para obtener el RR sin discriminar por sexo o edad. Como en otras publicaciones, también se calculó el rango de diagnóstico de K/L-CLL que incluye al 100 % de la población de referencia. Los resultados se muestran en la tabla III. Se estableció un nuevo RR para la diferencia entre K-L-CLL de -8,6 a 0,6 mg/L (el signo menos indica que L-CLL es mayor que K-CLL) y para la suma K+L-CLL de 12,4 a 32,8 mg/L como datos adicionales que podrían ayudar en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes.

La figura 2 muestra los resultados de la validación del rango de diagnóstico obtenido para K/L-CLL (0,44-

1,23). Los valores de los sujetos estudiados con hiper e hipogammaglobulinemia estaban incluidos tanto en nuestro rango como en el propuesto por el fabricante (0,26-1,65 obtenido de la bibliografía), dado que este último es más amplio que el que proponemos en nuestro estudio. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de K-CLL y L-CLL de las muestras de los pacientes con hipergammaglobulinemia (rango: K-CLL: 6,7-56,9 mg/L; L-CLL: 9,2-66,0 mg/L) y de los pacientes con hipogammaglobulinemia (rango: K-CLL: 4,9-11,3 mg/L; L-CLL: 7,0-17,6 mg/L) respecto a los donantes de sangre (test U de Mann-Whitney $p < 0,05$ en todos los casos).

Tabla III.
Rangos de referencia de 247 muestras de suero de donantes de sangre

	K-CLL (mg/L)	L-CLL (mg/L)	K/L-CLL	Dif K-L (mg/L)	Suma K+L (mg/L)
Media (DS)	8,7 (2,0)	12,2 (3,5)	0,73 (0,14)	-3,5 (2,4)	20,9 (5,17)
Mediana (RI)	8,5 (2,6)	11,7 (4,1)	0,70 (0,18)	-3,3 (1,4)	20,2 (6,7)
P 2,5 (IC 90 %)	<i>5,0</i> (4,6-5,7)	<i>6,6</i> (5,9-7,1)	0,49 (0,44-0,53)	<i>-8,56</i> (-11,1; -7,7)	<i>12,4</i> (11,4-13,0)
P 97,5 (IC 90 %)	<i>13,4</i> (12,5-13,8)	<i>20,4</i> (18,5-25,6)	1,05 (0,99-1,17)	<i>0,56</i> (-0,10 -1,3)	<i>32,8</i> (30,2-38,3)
Mínimo	3,6	5,8	0,44	-14,6	10,8
Máximo	14,8	28,2	1,23	1,6	41,8
RR fabricante	3,3-19,4	5,7-26,3	0,26-1,65		

Los resultados en cursiva indican los límites para la interpretación de resultados. DS: desviación estándar. RI: rango intercuartil. P: percentil. IC: intervalo de confianza. K: kappa. L: lambda. CLL: cadenas ligeras libres.

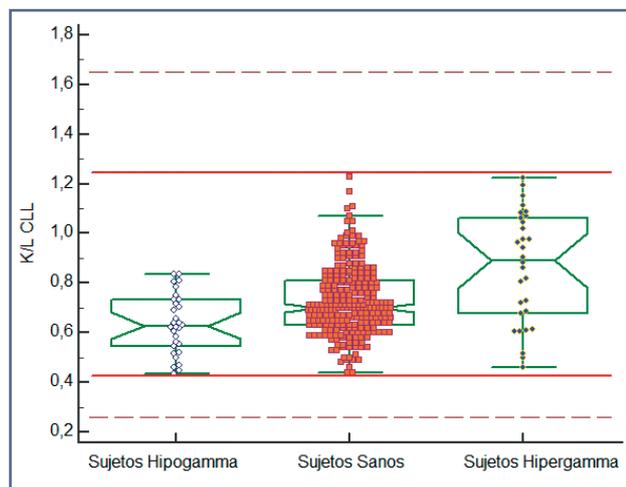


Figura 2 – Distribución de valores del cociente kappa/lambda de cadenas ligeras libres (K/L CLL) obtenidos de pacientes con hipo e hipergammaglobulinemia policlonal y donantes de sangre (línea continua: rango de diagnóstico calculado en este estudio; línea discontinua: rango de diagnóstico de la bibliografía).

DISCUSIÓN

La importancia que ha adquirido la medición de las sCLL con la inclusión en las guías del IMWG ha hecho que la industria de diagnóstico *in vitro* diseñe sus propios reactivos para diferentes plataformas. Como no existe un estándar internacional al que referenciarse, los valores que se obtienen entre las distintas tecnologías, los diferentes instrumentos e incluso con el mismo tipo de reactivos, son muy diferentes (Tabla IV).

Por eso es necesario establecer RR para cada una de esas combinaciones y para la población con la que se trabaja. El *insert* del fabricante hace alusión a los RR de la bibliografía (4), sin embargo hace un pequeño estudio y se puede comprobar que los resultados son similares en los valores centrales y tienen menos variabilidad al obtener unos rangos más estrechos. Los valores del estudio de Trimer frente a la bibliografía son: K-CLL (RR: 4,84-14,2 vs. 3,3-19,4), L-CLL (RR: 7,03-22,5 vs. 5,7-26,3) y K/L-CLL (rango diagnóstico: 0,43-1,05 vs. 0,26-1,65).

En nuestro estudio, los valores de K/L-CLL se mantienen con el incremento de la edad con una ligera tendencia descendente, mientras que en los valores de K-CLL y de L-CLL sí parece haber un pequeño aumento que podría estar causado por la disminución fisiológica del filtrado glomerular (Fig. 1). Esta misma circunstancia también se observó en el trabajo de Katzmann y cols. (4), con un aumento más acusado en edades > 60 años. Otros autores han informado de un aumento en el RR de K/L-CLL en poblaciones de edad avanzada, lo que sugeriría que los RR dependientes de la edad debían ser tenidos en cuenta (14,15). Otros autores no encontraron diferencias cuando compararon entre mayores y menores de 50 años (16).

Nuestros resultados indican que hay una dependencia de la edad, pero su variación cuantitativa puede considerarse clínicamente no significativa. En los gráficos de K-CLL/cistatina C y L-CLL/cistatina C, no mostrados, se observa que esa pendiente positiva disminuye considerablemente por lo que parece que ese pequeño aumento pueda ser debido a la disminución de la función renal que se produce de manera fisiológica. Cuando se compara por sexo también observamos ligeras

Tabla IV.

Rangos de referencia de diferentes ensayos de cadenas ligeras libres kappa (K-CLL, mg/L) y lambda (L-CLL, mg/L) y rangos de diagnóstico de la ratio kappa/lambda (K/L-CLL)

	K-CLL	L-CLL	K/L CLL
Trimer Diagnostic (estudio)	5,0 -13,4	6,6-20,4	0,44-1,23
Trimer Diagnostic (interno Trimer)	4,8-14,2	7,0-22,5	0,43-1,05
Freelite (TBS) (2,4) (Guía IMWG)	3,3-19,4	5,7-26,3	0,26-1,65
Freelite Optilite (17)	7,2-27,5	5,7-21,5	0,40-2,58
Freelite SPA Plus (17)	5,5-24,7	4,9-18,7	0,36-2,07
Freelite Immage (17)	5,8-17,4	7,4-24,5	0,20-1,26
Freelite Cobas (17)	8,1-29,8	8,6-19,9	0,50-2,43
N Latex FLC (8)	6,7-22,4	8,3-27,0	0,31-1,56
Sebia FLC (10)	5,2-15,3	8,2-18,1	0,37-1,44
Diazyme (9)	2,4-20,7	4,2-27,7	0,22-1,74
Seralite (5-95 %) (11)	5,2-22,7	4,0-25,1	0,48-2,49

diferencias y, aunque algunas son estadísticamente significativas, cuantitativamente no tienen gran trascendencia clínica. Dado que las diferencias observadas en sexo y edad no se consideran clínicamente relevantes, hemos considerado obtener un único RR, al igual que otros autores, aunque debe tenerse en cuenta esta tendencia con la edad.

En un estudio llevado a cabo por Cotten y cols. (17) en el que utilizaban reactivos Freelite en diferentes plataformas, los resultados del nefelómetro Immage (Beckman Coulter) fueron aceptables con respecto a los rangos publicados por Katzmman, sin embargo, los medidos en turbidímetros como Optilite (TBS), SPA Plus (TBS) o Cobas 6000 c601 (Roche Diagnostic) fueron significativamente más altos. Esto da una idea de la variabilidad de los resultados en función de los reactivos y la tecnología empleada (Tabla IV). En otros estudios de comparación se han detectado importantes diferencias llegando a la conclusión de que los resultados no son transferibles entre distintas plataformas.

Se han publicado estudios que utilizaban reactivos Freelite en los nefelómetros de Siemens Healtheneers (8) y Beckman Coulter (17) en los que los autores observan una alta concordancia clínica, aunque se encontraron importantes discrepancias en algunos resultados. Sin embargo, otros autores que compararon el mismo reactivo en estos nefelómetros han considerado que la concordancia no era aceptable (18,19).

Muchos de los estudios de comparación entre reactivos que utilizan anticuerpos policlonales (Freelite CLL, TBS) y reactivos que utilizan anticuerpos monoclonales (N Latex CLL, Siemens Healtheneers) detectan grandes diferencias en las comparaciones. Esto hace que los resultados no sean intercambiables y que se clasifiquen incorrectamente las muestras como patológicas y no patológicas. Las causas pueden ser la diferente composición de los reactivos y que la medición de Freelite se realiza en turbidímetros como Optilite o SPA Plus (6,7) u otras plataformas (20) y asumen que los RR para Freelite CLL son los obtenidos por Katzmman por nefelometría. Como queda patente en nuestro estudio y en la bibliografía, los RR tienen unas diferencias tan importantes que se podría pensar que las conclusiones de esos estudios podrían no ser correctas.

Una consideración importante en el diagnóstico, en la evaluación de la respuesta y de la remisión, y en el pronóstico de los pacientes con gammopatías monoclonales es la precisión de los RR de K-CLL, L-CLL, K/L-CLL y diferencia K-L para asegurar una interpretación clínicamente útil de los resultados de las pruebas. La adopción de los RR de CLL del fabricante y de la guía del IMWG, independientemente del tipo de plataforma del instrumento, podría sugerir que los RR de CLL son universales. Sin embargo, los reactivos para la medición de CLL están disponibles comercialmente en más de 10 plataformas y el efecto de la variabilidad entre instrumentos con diferente tecnología

debe ser tenido en cuenta. En el caso de la utilización del reactivo de Trimer Diagnostic un K/L-CLL entre 1,23-1,65 o entre 0,26-0,43 sería indicativo de proliferación monoclonal y, sin embargo, si utilizamos los valores de la guía IMWG serían totalmente normales (Tabla IV).

El hecho de que la guía del IMWG indicara unos RR concretos sin advertir de que no eran transferibles a otras plataformas ha generado confusión y pueden estar utilizando RR erróneos. Ni la ratio K/L CLL de 0,26-1,65, ni el de $i/u\text{-CLL} \geq 100$ o la concentración de la CLL involucrada > 100 mg/L serían valores correctos para la clasificación de los pacientes si no se usan los reactivos y el analizador empleado por Katzmman (18). Estudios publicados recientemente mostraron que los umbrales de diagnóstico para $i/u\text{-CLL} \geq 100$ propuestos para Freelite no se aplican a N Latex FLC y Sebia FLC. Se propusieron nuevos umbrales para N Latex FLC ≥ 30 (21) o ≥ 50 (22) y para Sebia FLC ≥ 16 (23) o ≥ 20 (22). La consecuencia clínica es que estos pacientes pueden o no cumplir con los criterios de MM que requieren terapia dependiendo del tipo de reactivo y la tecnología utilizada.

Como contribución original nosotros proponemos un nuevo RR para la diferencia K-L-CLL de -8,6 a 0,6 mg/L. En general, K/L-CLL se usa para el diagnóstico y seguimiento de gammopatías monoclonales y K-L-CLL es útil en la práctica clínica diaria porque, en las gammopatías monoclonales, además del aumento de la CLL involucrada, se suprime la no involucrada, y de esta diferencia no existen valores de referencia. Algunos autores han descrito otras utilidades de este parámetro, como la predicción de eventos tromboembólicos en pacientes con amiloidosis AL (24) o la distinción entre mieloma y no mieloma en pacientes con lesión renal aguda (25). Campbell y cols. (11) proporcionó un RR de K-L-CLL para la prueba Seralite y evaluó su comportamiento en pacientes con mieloma múltiple. El rango de diferencia K-L podría ayudar en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes y debe evaluarse en estudios posteriores.

La inmunodeficiencia común variable (IDCV) tiene una alta variabilidad clínica y heterogeneidad inmunológica. Varios investigadores han propuesto combinaciones de biomarcadores clínicos e inmunológicos para mejorar el diagnóstico y proporcionar estrategias de seguimiento y tratamiento que puedan mejorar el pronóstico de cada paciente. Un biomarcador propuesto recientemente para el diagnóstico de IDCV es la cuantificación de sCLL (26-28). Guevara-Hoyer y cols. (29) han sugerido la suma de K+L-CLL como un biomarcador combinado práctico del diagnóstico de IDCV y otras aplicaciones potenciales para su seguimiento y pronóstico. Han obtenido un punto de corte para discriminar entre IDCV y otras inmunodeficiencias. La mayoría de los pacientes con IDCV presentan sCLL bajos o indetectables en comparación con inmunodeficiencias primarias o secundarias. Proponemos un nuevo RR que no ha

sido definido hasta el momento para la suma de K+L-CLL de 12,4-32,8 mg/L con los reactivos de Trimer Diagnostic.

En la validación del rango de diagnóstico K/L-CLL obtenido con muestras con hipogammaglobulinemia policlonal e hipergammaglobulinemia policlonal todos los valores estaban dentro del nuevo RR, lo que confirma la validez del nuevo rango. Como era de esperar, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre las concentraciones de K-CLL y L-CLL de las muestras de estos pacientes y las de los donantes de sangre.

Entre los factores que pueden influir en la obtención de resultados diferentes en los distintos estudios podemos encontrar variables pre- y post-analíticas como el número de sujetos evaluados en el estudio, los criterios de inclusión y exclusión, la utilización de uno o varios lotes de reactivos, el análisis estadístico realizado (eliminación de outliers, método basado en distribución normal, método no paramétrico CLSI EP28-A3C o la utilización del método robusto).

Este estudio tiene fortalezas como los criterios de inclusión y exclusión que han hecho que los RR sean más estrechos que otros publicados (4,17,20). Como limitaciones podemos considerar el rango de edad hasta los 65 años, si bien algunos autores solo detectaron diferencias significativas a partir de 80 años (4,14,15); y también la utilización de un único lote de reactivos. En numerosas ocasiones se ha citado la falta de consistencia entre lotes de reactivos policlonales como Freelite (16,30) y esto puede ser causa de una alta variabilidad en los resultados y unos RR más amplios, sobre todo en el límite superior.

CONCLUSIONES

En este estudio presentamos RR de sCLL para reactivos de Trimer Diagnostics medidos por turbidimetría en un AU5800 de Beckman Coulter. Estos rangos son diferentes a los proporcionados por el fabricante, que son los indicados en las guías IMWG, utilizados en la mayoría de estudios publicados, lo que consideramos ha podido suponer una clasificación errónea de los pacientes.

Como contribución original se proponen RR para K-L-CLL y K+L-CLL que no han sido descritos previamente para este reactivo. La utilidad de estos RR debe investigarse en futuros estudios.

Debido a las diferencias entre reactivos monoclonales y policlonales y las distintas plataformas con diferente tecnología que se utilizan para medir las sCLL, la variabilidad en los rangos es elevada y no pueden existir unos RR ni puntos de corte únicos y universales. Por esa razón, es necesario disponer de un estándar internacional para minimizar las diferencias.

Los fabricantes y los laboratorios clínicos deben esforzarse para proporcionar unos RR para la tecnología que están utilizando y para su población.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tosi P, Tomassetti S, Merli A, Polli V. Serum free light-chain assay for the detection and monitoring of multiple myeloma and related conditions. *Ther Adv Hematol* 2013;4(1):37-41. DOI: 10.1177/2040620712466863
2. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15(12):e538-548. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5
3. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016;17(8):e328-46.
4. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem* 2002;48(9):1437-44. DOI: 10.1093/clinchem/48.9.1437
5. Kim H-S, Kim HS, Shin K-S, Song W, Kim HJ, Kim HS, et al. Clinical comparisons of two free light chain assays to immunofixation electrophoresis for detecting monoclonal gammopathy. *BioMed Res Int* 2014;2014:647238.
6. Maisin D, Lepoutre T, Gruson D, Wallemacq P. Quantification of serum free light chain kappa and lambda by the SPAPLUS analyser. *Clin Biochem* 2013;46(7-8):622-6. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.12.015
7. White-Al Habeeb NMA, Earle T, Spencer M, Blasutig IM. Evaluation of the N-latex serum free light chain assay on the Siemens BNII analyzer and agreement with The Binding Site FreeLite assay on the SPAPLUS. *Clin Biochem* 2018;51:90-6. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2017.05.009
8. Velthuis H, Knop I, Stam P, van den Broek M, Bos HK, Hol S, et al. N Latex FLC – new monoclonal high-performance assays for the determination of free light chain kappa and lambda. *Clin Chem Lab Med* 2011;49(8):1323-32.
9. Smith A, Wu AHB. Analytical and clinical concordance of free light chain assay. *Pract Lab Med* 2019;13:e00112. DOI: 10.1016/j.plabm.2018.e00112
10. Jacobs JFM, de Kat Angelino CM, Brouwers HMLM, Croockewit SA, Joosten I, van der Molen RG. Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods. *Clin Chem Lab Med* 2018;56(2):312-22. DOI: 10.1515/cclm-2017-0339
11. Campbell JP, Heaney JLJ, Shemar M, Baldwin D, Griffin AE, Oldridge E, et al. Development of a rapid and quantitative lateral flow assay for the simultaneous measurement of serum κ and λ immunoglobulin free light chains (FLC): inception of a new near-patient FLC screening tool. *Clin Chem Lab Med* 2017;55(3):424-34. DOI: 10.1515/cclm-2016-0194
12. Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, Eckfeldt JH, Feldman HI, Greene T, et al. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med* 2012;367(1):20-9. DOI: 10.1056/NEJMoa1114248
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline EP28-A3C. 3rd ed. Vol. 28. CLSI; 2010.
14. Hernandez JM, Muñoz H, Jimenez-Cobaleda MJ, Quiñez JA, Latorre M, de la Hoz B, et al. Normal ranges and reference intervals of serum free light chains values are higher in elderly people: study in a Spanish urban population. *Haematologica* 2011;96:0863a.
15. Machalkova K, Vavrova J, Maisnar V, Radocha J, Tichy M. Age dependency of reference values of immunoglobulin heavy/light chain pairs and free light chains serum levels. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013;13:P-418a.
16. Altinier S, Seguso M, Zaninotto M, Varagnolo M, Adami F, Angeli P, et al. Serum free light chain reference values: a critical approach. *Clin Biochem* 2013;46(7-8):691-3. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.01.014

17. Cotten SW, Shajani-Yi Z, Cervinski MA, Voorhees T, Tuchman SA, Korpi-Steiner N. Reference intervals and diagnostic ranges for serum free κ and free λ immunoglobulin light chains vary by instrument platform: Implications for classification of patient results in a multi-center study. *Clin Biochem* 2018;58:100-7. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2018.06.003
18. Lock RJ, Saleem R, Roberts EG, Wallage MJ, Pesce TJ, Rowbottom A, et al. A multicentre study comparing two methods for serum free light chain analysis. *Ann Clin Biochem* 2013;50(Pt 3):255-61. DOI: 10.1177/0004563212473447
19. Yang Y, Han X, Zheng G, Cai Z. Comparison of two serum free light chain assays for the diagnosis of primary plasma cell malignant proliferative disease. *Health Sci Rep* 2019;2(4):e113. DOI: 10.1002/hsr2.113
20. Mohammed N, Chandran PA, Kandregula M, Mattaparthi RD, Gundeti S, Volturi J, et al. Robust reference intervals for serum kappa and lambda free light chains from a multicentre study population from Hyderabad, India: myeloma diagnostic implications. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2016;17(5):2605-10.
21. Bossuyt X, Delforge M, Reynders M, Dillaerts D, Sprangers B, Fostier K, et al. Diagnostic thresholds for free light chains in multiple myeloma depend on the assay used. *Leukemia* 2018;32(8):1815-8. DOI: 10.1038/s41375-018-0041-0
22. Schieferdecker A, Hörber S, Ums M, Besemer B, Bokemeyer C, Peter A, et al. Comparison of three different serum-free light-chain assays-implications on diagnostic and therapeutic monitoring of multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2020;10(1):2. DOI: 10.1038/s41408-019-0267-8
23. Caillon H, Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Decaux O, Dejoie T. Comparison of Sebia free light chain assay with Freelite assay for the clinical management of diagnosis, response, and relapse assessment in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2019;19(5):e228-37. DOI: 10.1016/j.clml.2019.01.007
24. Park H, Kim J-W, Youk J, Koh Y, Lee J-O, Kim KH, et al. Serum free light chain difference and β 2 microglobulin levels are risk factors for thromboembolic events in patients with AL amyloidosis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2018;18(6):408-14. DOI: 10.1016/j.clml.2018.03.005
25. Heaney JLJ, Campbell JP, Yadav P, Griffin AE, Shemar M, Pinney JH, et al. Multiple myeloma can be accurately diagnosed in acute kidney injury patients using a rapid serum free light chain test. *BMC Nephrol* 2017;18(1):247. DOI: 10.1186/s12882-017-0661-z
26. Compagno N, Cinetto F, Boscaro E, Semenzato G, Agostini C. Serum free light chains in the differential diagnosis and prognosis of primary and secondary hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135(4):1075-1077.e6. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.10.003
27. Scarpa R, Pulvirenti F, Pecoraro A, Vultaggio A, Marasco C, Ria R, et al. Serum free light chains in common variable immunodeficiency disorders: role in differential diagnosis and association with clinical phenotype. *Front Immunol* 2020;11:319. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00319
28. Hanitsch LG, Sotzny F, Volk H-D, Scheibenbogen C, Witke K. Serum free light chains in CVID -a marker for differential diagnosis. *J Clin Immunol* 2018;38(2):163-5. DOI: 10.1007/s10875-018-0478-y
29. Guevara-Hoyer K, Ochoa-Grullón J, Fernández-Arquero M, Cárdenas M, Pérez de Diego R, Sánchez-Ramón S. Serum free immunoglobulins light chains: a common feature of common variable immunodeficiency? *Front Immunol* 2020;11:2004. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02004
30. Tate JR, Mollee P, Dimeski G, Carter AC, Gill D. Analytical performance of serum free light-chain assay during monitoring of patients with monoclonal light-chain diseases. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2007;376(1-2):30-6. DOI: 10.1016/j.cca.2006.07.011



Revisión

Utilidad de los algoritmos de priorización de variantes con significado clínico desconocido en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario

Utility of algorithms for prioritization of variants with unknown significance in hereditary breast and ovarian cancer

Verónica Castillo Guardiola¹, M.^a Desamparados Sarabia Meseguer¹, Laura Rosado Jiménez¹, Miguel Marín Vera², José Antonio Macías Cerrolaza³, Encarnación Cuevas Tortosa², Francisco Ruiz Espejo¹, José Antonio Noguera Velasco¹

¹Laboratorio de Genómica. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia. ²Servicio de Oncología Médica. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia. ³Servicio de Oncología Médica. Hospital General Universitario Morales Meseguer. Murcia

Recibido: 06/08/2020
Aceptado: 05/03/2021

Correspondencia: Verónica Castillo Guardiola. Laboratorio de Genómica. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Ctra. Madrid- Cartagena, s/n. 30120 El Palmar, Murcia
e-mail: veronicacgu.88@gmail.com

Palabras clave:

Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario. Priorización. Variante con significado clínico desconocido.

RESUMEN

La aparición de la secuenciación de nueva generación ha supuesto una revolución en el estudio genético del síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SCMOH), ya que ha permitido la incorporación a la práctica clínica de paneles de genes, o incluso de exomas y genomas completos. El gran aumento de la información que se obtiene de un estudio genético ha ido unido a un incremento de la incertidumbre debido al mayor número de variantes con significado desconocido (VUS) halladas. En consecuencia, recientemente se ha acuñado el concepto de VUS priorizada, que hace referencia a aquellas variantes con significado clínico desconocido que, según la bibliografía disponible, presentan un mayor riesgo de ser deletéreas. En esta revisión se pretende mostrar la evolución de las guías de clasificación clínica de variantes, destacar la necesidad del desarrollo de algoritmos de

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00039

Castillo Guardiola V, Sarabia Meseguer MD, Rosado Jiménez L, Marín Vera M, Macías Cerrolaza JA, Cuevas Tortosa E, Ruiz Espejo F, Noguera Velasco JA. Utilidad de los algoritmos de priorización de variantes con significado clínico desconocido en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario. Rev Med Lab 2021;2(1):21-29

priorización para seleccionar estas VUS priorizadas que permitan optimizar la realización de estudios complementarios, así como advertir de la importancia de realizar un correcto proceso de asesoramiento genético que haga entender al paciente las posibles consecuencias de dicho análisis.

Keywords:

Hereditary breast and ovarian cancer. Priorization. Genetic variation with unknown significance. Variants with unknown significance.

ABSTRACT

The incorporation of next-generation sequencing has been a revolution in the genetic study of hereditary breast and ovarian cancer (HBOC), as it has allowed the incorporation in clinical practice of multigene panel testing and even complete exomes and genomes. It has led an increase of information obtained in genetic studies. However, it has been accompanied by an uncertainty raise due to the higher number of variants with unknown significance (VUS) found. Consequently, the term prioritized VUS that refers to those variants with unknown significance that has a greater risk of being deleterious has been coined. This revision pretends to show the evolving of classification guidelines for the interpretation of variants, emphasize the importance of the development of prioritization algorithms that select prioritize and allows optimizing the complementary studies employed, as well as emphasize the importance of a correct genetic counseling that helps the patient understand the consequences of the analysis.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) es el más común, así como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (1). El CM femenino supone un 25 % de los casos de cáncer diagnosticados en todo el mundo y un 11,6 % si se tienen en cuenta ambos sexos (2). La mortalidad por CM en España es el 6,6 % de la mortalidad por cáncer (3). Los datos de Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) estiman que en 2020 se diagnosticaron aproximadamente 33.000 nuevos casos de CM en España y, en 2018 6.621 muertes fueron debidas a esta causa (3).

El cáncer de ovario (CO) es el noveno tipo de cáncer más prevalente en mujeres en España y se estima que supone un 2,7 % de los casos de cáncer y casi 2000 muertes en 2020 (3,4). El riesgo de padecer CO, cáncer de trompa de Falopio o primario peritoneal es del 1,5 % en la población general. A pesar de los avances en su tratamiento quirúrgico y farmacológico, el CO sigue siendo el cáncer ginecológico más letal, debido principalmente a la ausencia de un método de cribado para su detección precoz. Además, presenta una elevada resistencia a los fármacos citostáticos usados comúnmente (5).

Se han identificado numerosos factores de riesgo para ambas patologías, siendo la historia familiar uno de ellos. De hecho, se estima que el 5-10 % de todos los casos de CM y CO están vinculados a una susceptibilidad hereditaria debida a mutaciones en genes autosómicos dominantes. El principal síndrome de cáncer hereditario relacionado con el CM y CO es el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SCMOH). Desde los años 90 este síndrome se ha asociado principalmente a mutaciones en los genes de alta penetrancia *BRCA1* y *BRCA2*. Sin embargo, en la actualidad se sugiere la participación de múltiples genes, entre los

que se incluyen genes de alto riesgo para CM (*TP53*, *PTEN* y *PALB2*), así como genes de moderado riesgo de CM (*CHEK2*, *ATM*, *NF1* y *NBN*), genes con riesgo de CM impreciso pero elevado (*CDH1* y *STK11*) y genes con riesgo para CO (*RAD51D*, *BRIP1*, y genes del sistema de reparación de apareamientos erróneos como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*), entre otros (6). Estos genes se asocian con susceptibilidad a otros tipos de cáncer como el de páncreas, colon y próstata, entre otros. Muchos de ellos son esenciales para mantener la estabilidad genómica de las células y están relacionados funcionalmente con la reparación de DNA mediante recombinación homóloga.

La aparición de la secuenciación masiva ha permitido el desarrollo de paneles de genes, los cuales facilitan el estudio de múltiples genes en el mismo análisis con un menor coste económico. Esto ha supuesto una revolución en la práctica clínica en el campo del diagnóstico del cáncer hereditario, ya que el aumento de genes estudiados facilita el diagnóstico de síndromes como el SCMOH. A su vez esto ha ido acompañado de un incremento de la incertidumbre debido a dos causas principales: el aumento de variantes con significado clínico desconocido (VUS) como consecuencia del mayor número de genes estudiados y el estudio de genes para los que no existe suficiente experiencia en la práctica clínica ni evidencia científica que permita asociarlos con un incremento en el riesgo de padecer cáncer.

En muchas ocasiones la interpretación de toda esta información no es sencilla, lo que supone un reto para los profesionales del laboratorio. Aunque actualmente hay distintas guías de clasificación de variantes que tratan de sistematizar y estandarizar el proceso de categorización clínica de variantes, y establecer un vínculo entre los resultados obtenidos y su efecto clínico (7,8), no resuelven el problema de la interpretación de la in-

formación genética, ya que muchas de las variantes siguen clasificándose como VUS. Para muchos de los genes incluidos en los paneles comerciales de cáncer hereditario no existe evidencia suficiente que justifique un cambio en el manejo clínico, como el empleo de tratamientos específicos o aplicación de medidas de prevención para detección precoz o reducción de riesgo. Sigue existiendo una incertidumbre debida principalmente a que muchos de los genes incluidos en estos paneles comenzaron a estudiarse con el desarrollo de dichos paneles. Debido a la ausencia de estudios clínicos de correlación genotipo-fenotipo consistentes, la relación entre la presencia de variantes patogénicas en estos genes y el riesgo de padecer determinados tipos de cáncer es todavía limitada. Por lo tanto, para muchos de los genes incluidos en los paneles comerciales no existe evidencia suficiente que justifique un cambio en el manejo clínico, como el empleo de tratamientos específicos o aplicación de medidas de prevención para detección precoz o reducción de riesgo.

Recientemente y debido a la expansión del uso clínico de los paneles de genes se ha acuñado el concepto de VUS priorizada. Este hace referencia a aquellas variantes de significado clínico desconocido que tendrían una mayor probabilidad de tener un efecto deletéreo en la proteína, según los estudios *in silico* y la bibliografía (9).

GUÍAS PARA LA CLASIFICACIÓN DE VARIANTES GÉNICAS

Diferentes sociedades científicas han desarrollado guías para la interpretación de variantes con el objeto de afrontar el reto que supone actualmente el incremento de detección de nuevas variantes génicas, muchas de ellas en genes poco estudiados previamente. Esto ayuda a conseguir una estandarización en la interpretación por parte de los distintos profesionales a lo largo del mundo.

El Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG) publicó en 2000 unas recomendaciones para la interpretación de variantes que posteriormente fueron revisadas en 2008 (10). Las variantes se categorizaban en 6 grupos en función de si se habían descrito previamente y su potencial efecto deletéreo. Se hacía énfasis sobre la importancia de utilizar una terminología estandarizada y bases de datos establecidas a la hora de reportar las variantes, así como de informar sobre las limitaciones del análisis. Además, se establecían actividades de seguimiento para clarificar la relación de las VUS y la patología en cuestión: estudio de familiares, estudio en controles o uso de herramientas *in silico*.

Posteriormente, Lindor y cols. desarrollaron un modelo de clasificación de variantes en cinco categorías (11). Paralelamente, la Sociedad Internacional de Tumores Gastrointestinales Hereditarios desarrolló un esquema estandarizado de clasificación de variantes en cinco clases (12).

Más recientemente la ACMG, junto con la Asociación de Patología Molecular (AMP) y el Colegio de Patólogos Americanos (CAP), desarrollaron unas nuevas guías de interpretación de variantes (7). Estas guías establecían unos criterios de clasificación que presentaban distintos grados de evidencia de patogenicidad y de benignidad de forma que, mediante un algoritmo que utilizaba la combinación de dichos criterios, las variantes se podían clasificar como patogénicas, probablemente patogénicas, con significado clínico desconocido o probablemente benignas y benignas. Esto supuso un gran paso en la normalización de la categorización clínica de variantes, ya que pretendía que dicha interpretación se realizara de una forma más objetiva y sistemática. Posteriormente, se publicó un refinamiento de dichos criterios de clasificación que pretendía mejorar aquellas áreas en las que las guías previas carecían de especificidad o daban lugar a interpretaciones ambiguas. Este refinamiento consistió en tres puntos principales: separar aquellos criterios que resultaban ambiguos en un grupo de reglas discretas pero relacionadas en las que cada una de ellas aporta un peso individual a la clasificación, agrupar determinados criterios para evitar una sobreestimación de evidencia relacionada entre sí y reemplazar los "criterios clínicos" por criterios aditivos semicuantitativos (8).

Toda esta evolución en la interpretación de variantes, aunque ha permitido sistematizar su interpretación, no ha evitado el aumento de VUS que ha supuesto la instauración en la clínica del estudio mediante paneles de genes, o incluso exomas y genomas completos.

PRIORIZACIÓN DE VARIANTES CON SIGNIFICADO DESCONOCIDO

Los métodos de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) engloban las técnicas de secuenciación de segunda y tercera generación. En las primeras, la secuenciación se realiza a partir de fragmentos amplificados y se obtiene una elevada profundidad de lectura (número de veces que una base está presente en las lecturas generadas). Por otro lado, las técnicas de tercera generación han conllevado una nueva revolución, ya que no requieren amplificación previa de la muestra y permiten aumentar la longitud de la lectura, lo que facilita el ensamblaje y permite la detección de variantes en el número de copias (CNV) e incluso alteraciones estructurales como translocaciones e inversiones. La rápida evolución de dichas tecnologías con el consecuente aumento de variantes detectadas ha hecho necesaria la aparición de un nuevo concepto: VUS priorizada. El término VUS priorizada se refiere a aquellas VUS que tienen un mayor riesgo de estar asociadas a un incremento de cáncer de mama y ovario y, por tanto, sobre las que se debe realizar un estudio más completo para poder determinar su efecto clínico y posible implicación en el SCMOH de forma prioritaria con respecto al resto de VUS. Mucaki y cols. desarrollaron un esquema para priorizar VUS en SCMOH, en el que

se incluyeron variantes exónicas, variantes de *splicing* situadas en regiones codificantes y no codificantes, así como variantes situadas en las regiones UTR 3' y 5', entre otras (13) (Fig. 1). Para ello emplearon modelos basados en teoría de la información (*IT-based analysis*). La teoría de la información se usa como una medida de la conservación de la secuencia. La información individual para una base se relaciona con su entropía y, por tanto, con la energía libre de unión. Esto se utiliza para estimar el cambio de afinidad de unión al compararlo con el cambio de información para un cambio de nucleótido. Estos modelos predecían potenciales mutaciones en sitios de *splicing* (SS), sitios de unión a factores de transcripción (TGBS) y sitios de unión a la proteína de

unión a RNA (RBBS) en 7 genes secuenciados al completo en una muestra de 102 pacientes con SCMOH en los que previamente no se habían hallado variantes en regiones codificantes de *BRCA1/2*. A continuación se utilizaron unos criterios de priorización e información de la bibliografía disponible para priorizar las que más probabilidad presentaban de ser deletéreas. Se emplearon distintas herramientas *in silico*, así como bases de datos, modelos o algoritmos de predicción de estructuras. Se hallaron 15311 variantes, de las cuales 87 fueron priorizadas. Caminsky y cols. realizaron un estudio similar en el que se estudiaron 20 genes relacionados con SCMOH en 287 pacientes con un test no informativo previo para *BRCA1/2*. Se priorizaron 246 de un total de

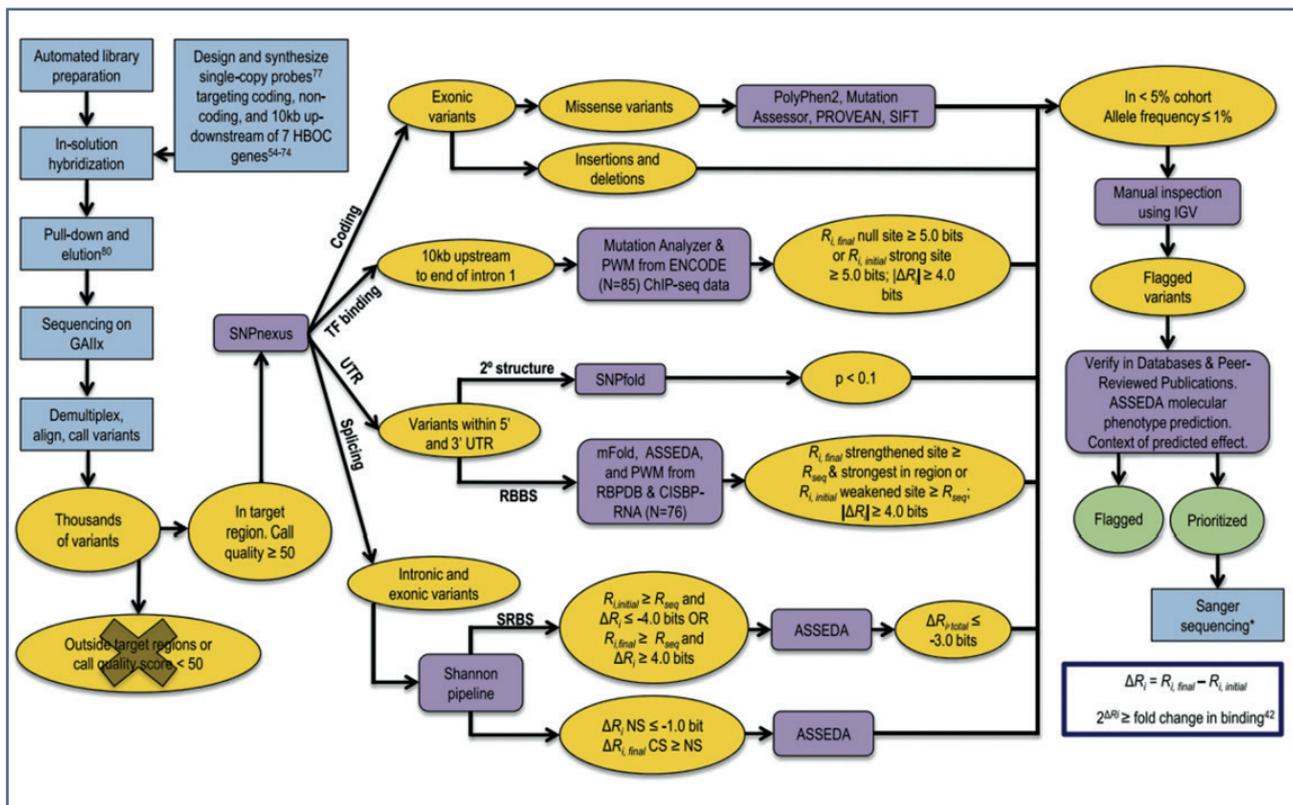


Figura 1 – Adaptación del algoritmo para la identificación de potenciales variantes patogénicas utilizado por Mucaki y cols. (13). Incluye procesos integrados de laboratorio y análisis bioinformáticos utilizados. En amarillo se muestran los conjuntos de datos intermedios resultantes del filtrado, en verde se muestran los conjuntos de datos finales, en azul los pasos no bioinformáticos como la preparación de las muestras y en violeta los programas de predicción. Para alinear los resultados de secuenciación se utilizó CASAVA (Consensus Assessment of Sequencing and Variation) y CRAC (Complex Reads Analysis and Classification). Se utilizó GATK (Genome Analysis Toolkit) para comparar las variantes de estos datos frente a la versión GRCh37 del genoma humano de referencia. Se eliminaron las variantes con una puntuación de calidad < 50. Se utilizó SNPnexus para identificar la ubicación genómica de las variantes. Las variantes sin sentido y las indels se anotaron y se utilizaron herramientas de predicción para estimar el potencial efecto deletéreo de las variantes missense. El pipeline de análisis Shannon evaluó el efecto de una variante sobre sitios de *splicing* (SS) crípticos y naturales, así como de lugares de unión de factores reguladores del *splicing* (SRFBBS). ASSEDA (Automated Splice Site and Exon Definition Analysis) se utilizó para predecir las posibles isoformas como resultado de estas variantes. Las matrices de peso de posición (PWM) para 83 factores de transcripción (TF) se construyeron utilizando un generador de matriz de ponderación de información basado en *Bipad*. Mutation Analyzer evaluó el efecto de las variantes encontradas 10 kb aguas arriba desde el primer intrón. Las variantes halladas en las secuencias UTR se evaluaron utilizando SNPfold y las variantes con mayor probabilidad de alterar la estructura del ARNm ($p < 0,1$) se procesaron utilizando mFold para predecir el efecto sobre la estabilidad. Todas las variantes de UTR se escanearon con una versión modificada del pipeline de Shannon, que utiliza PWM calculadas a partir de frecuencias de nucleótidos para 28 proteínas de unión a RNA (RBP) en las bases de datos de RPB (RBPDB) y 76 RBP en el catálogo de preferencias de unión a secuencias inferidas de proteínas de unión a RNA (CISBP-RNA). Todas las variantes que cumplen estos criterios de filtrado se verificaron con IGV.

38372 variantes. Se realizaron estudios de pedigrí y cosegregación para calcular las razones de verosimilitud (*likelihood ratio*) (14). En España, Bonache y cols. introdujeron por primera vez en nuestro país el concepto de VUS priorizada y diferenciaron los genes con un conocido alto-moderado riesgo de cáncer de aquellos genes candidatos para los que solo existe una evidencia inicial de asociación a cáncer (9). Se investigó un panel que incluía 34 genes asociados con un riesgo moderado-alto de cáncer de mama y ovario y 63 genes candidatos en 192 pacientes con sospecha de SCMOH, resultando 16 de ellos portadores de variantes en genes de riesgo. Se hallaron 383 variantes de las que se priorizaron 35 en genes de riesgo mediante el uso de bases de datos y programas *in silico*. Por otro lado, en este estudio se hacía referencia al concepto de accionabilidad clínica (*clinical actionability*), la cual se definió como un cambio en el manejo médico de la familia de acuerdo a las guías clínicas actuales, como las de la NCCN (National Comprehensive Cancer Network) (15). Este concepto se restringió a los portadores de variantes patogénicas en genes con un riesgo de cáncer bien establecido.

De esta breve revisión de estudios en los que aparece el concepto de VUS priorizada, destacan dos factores a tener en cuenta a la hora de determinar qué VUS deben priorizarse y cuáles no: los genes de estudio y las herramientas *in silico* y *pipelines* aplicadas en los algoritmos de priorización.

Genes de riesgo y genes candidatos en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario

Hasta hace unos años solo se planteaba el estudio de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Actualmente estos genes son bien conocidos, lo que ha permitido reducir el número de VUS halladas en los mismos. De hecho, en un estudio español de mutaciones en estos genes realizado por Gabaldó y cols. solo el 13 % de las variantes halladas fueron VUS (16). El desarrollo de los paneles de genes ha supuesto una verdadera revolución y ha conseguido modificar la práctica clínica en el campo del SCMOH, ya que al aumentar el número de genes estudiados, también se incrementa el número de VUS y la priorización de las mismas se hace más necesaria. La mayoría de los genes incluidos en los paneles de genes empleados para el diagnóstico del SCMOH son esenciales para la estabilidad genómica celular y están relacionados con la reparación de daño en el DNA mediante recombinación homóloga, como *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *BRIP1* y *BARD1*, entre otros (Fig. 2). Estos genes también están asociados a susceptibilidad a otros tipos de cáncer como el de próstata, páncreas o colorrectal (17-21).

Para los profesionales del laboratorio supone un reto decidir los genes a incluir en un panel de genes, cuáles reflejar en el informe de laboratorio, así como los que se tendrán en cuenta en el caso de llevar a cabo una priorización de VUS. Es necesario contar con la eviden-

cia disponible en las guías clínicas, así como llegar a un consenso con los responsables del asesoramiento genético. La SEOM recomienda que cuando se realice un análisis genético mediante paneles de genes, se incluyan en el análisis genes como *TP53*, *PALB2*, *BRIP1*, *RAD51C* y *RAD51D*. En cuanto a otros genes como *PTEN* o *CDH1*, su estudio debe plantearse en función de la historia familiar (6). Las guías consenso para el análisis de cáncer de mama hereditario desarrollada por la Asociación Americana de Cirugía de Mama (The American Society of Breast Surgeons) establecieron varios grupos de genes: aquellos con riesgo incrementado de CM (*ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *NF1*, *PALB2* y *STK11*), los que suponen un incremento de riesgo de cáncer ginecológico (*BARD1*, *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*, *BRIP1*, *RAD51C* y *RAD51D*) y los que están asociados a otros síndromes de cáncer hereditario como el síndrome de Li Fraumeni y el síndrome de Cowden (*TP53* y *PTEN*, respectivamente) (22). Las guías actuales de la NCCN recogen aquellos genes sobre los que existe evidencia de incremento de riesgo de cáncer (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*, *NBN*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11* y *TP53*), así como el manejo del riesgo de cáncer basado en los resultados del análisis genético (medidas de prevención de riesgo o de detección precoz). Además se mencionan genes para los que la evidencia es insuficiente para asociarlos con riesgo de padecer cáncer de mama y ovario (*BARD1*, *FANCC*, *MRE11A*, heterocigotos en *MUTYH*, *RECQL4*, *RAD50* y *XRCC2*, entre otros) (23). Estos genes serían genes candidatos sobre los que se requiere profundizar y aumentar su conocimiento para determinar si están realmente vinculados a un incremento de riesgo de cáncer, su penetrancia, las posibles particularidades fenotípicas asociadas a mutaciones en los mismos y, por tanto, su accionabilidad clínica llegado el caso. En el caso de incluir genes candidatos en un análisis genético es necesario recoger la mayor información clínica posible de aquellas familias portadoras de variantes patogénicas o probablemente patogénicas en dichos genes. Los profesionales del laboratorio pueden registrar dichas variantes, características de la familia y de los tumores en una base de datos privada o en bases de datos públicas como *ClinVar* para ir incrementando el conocimiento sobre dichos genes y poder llegar a conclusiones sobre su implicación clínica en el futuro.

Herramientas utilizadas en la clasificación y priorización de variantes

Actualmente hay múltiples herramientas web (muchas de acceso gratuito) que se pueden emplear para la interpretación de variantes (Tabla I). Conocerlas es de gran importancia para saber si dichas variantes han sido previamente descritas y clasificadas clínicamente o si, por el contrario, son variantes no descritas y por tanto se desconoce su implicación en la clínica de los

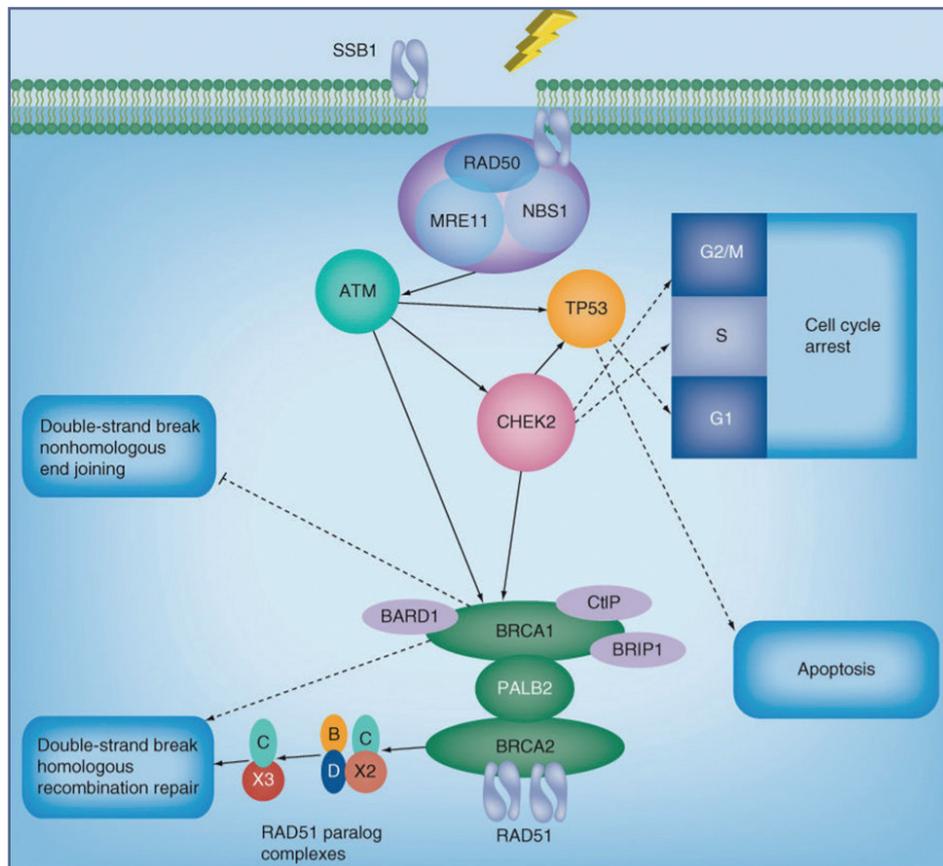


Figura 2 – Secuencia de reparación tras la detección del daño de ADN de doble cadena. Adaptado de Tavtigian y cols. (45). Tras la detección del daño de ADN de doble cadena, el complejo MRN (MRE11, NBS1 y RAD50) activa la ATM kinasa. Una vez fosforilada, ATM fosforila a posteriores efectores como CHEK2 y p53, los cuales producen la detención del ciclo celular para dar tiempo a que se repare el ADN. A su vez, p53 juega un papel importante en la señalización de la apoptosis. Finalmente, se produce el reclutamiento de las proteínas responsables de la reparación de ADN mediante recombinación homóloga, activándola.

pacientes. En el caso de las VUS, estas pueden incluirse en algoritmos de priorización, combinando la información que ofrecen o estableciendo puntos de corte en las puntuaciones obtenidas en los estudios *in silico*. A continuación se describen los principales recursos disponibles para valorar clínicamente las variantes génicas halladas en un estudio:

- **Bases de datos de variantes génicas.** Se trata de bases de datos creadas por grupos de trabajo especializados que están disponibles en la red. En ellas se reportan variantes génicas con información sobre su implicación clínica o fuentes bibliográficas en las que se mencionan. Entre ellas se encuentra *ClinVar* (24), *dbSNP* (25), *HGMD* (26), *LOVD* (27) y *LitVar* (28), entre otras.
- **Programas predictivos o estudios in silico.** Los algoritmos que utilizan estos programas son diferentes e incluyen la importancia de la alteración tanto a nivel de nucleótido como a nivel de aminoácido. Se pueden dividir en dos grupos: aquellos programas que predicen si el cambio es perjudicial para la función o estructura de la proteína resultante (predic-

tores del impacto del cambio como *PolyPhen2* (29), *SIFT* (30), *MutationTaster* (31), *Align-GVGD* (32), *Grantham* (33) o predictores del grado de conservación filogenética como *GERP* (34), *SiPhy* (35), *PhyloP* (36) y programas que predicen si se altera el *splicing* (*GeneSplicer* [37], *Human Splice Finder* [38], *NNSplice* [39] o *MaxEntScan* [40], entre otros).

- **Evaluación de la frecuencia de la variante en población control.** Determinar la frecuencia de una variante en la población general o en una población control es de utilidad para conocer su patogenicidad. Esto se puede hacer mediante una búsqueda en las bases de datos poblacionales como la del Proyecto 1000 Genomas o de la Genome Aggregation Database (gnomAD). Según las guías de la ACMG/AMP del año 2015, una frecuencia alélica en población control superior a la esperada para una determinada enfermedad apoya una interpretación benigna (7).
- **Software de apoyo a decisiones.** Se trata de herramientas web que integran información de distintas bases de datos y que la combinan para llevar a cabo una clasificación según las guías clínicas

Tabla I.
Resumen de los principales recursos disponibles para valorar clínicamente las variantes

Bases de datos de variantes génicas	<i>ClinVar</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
	<i>dbSNP</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
	<i>HGMD</i>	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
	<i>LOVD</i>	http://www.lovd.nl/3.0/home
	<i>LitVar</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/LitVar
Programas predictivos <i>in silico</i>		
Predicción de impacto en la proteína	<i>PolyPhen-2</i>	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
	<i>SIFT</i>	https://sift.bii.a-star.edu.sg/
	<i>MutationTaster</i>	http://www.mutationtaster.org/
	<i>Align-GVGD</i>	http://agvgd.hci.utah.edu
Predicción del grado de conservación filogenética	<i>GERP</i>	Integrado en <i>VarSome</i>
	<i>SiPhy</i>	Integrado en <i>VarSome</i>
	<i>PhyloP</i>	Integrado en <i>VarSome</i>
Predicción sobre el <i>splicing</i>	<i>GeneSplicer</i>	https://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml
	<i>Human Splice Finder</i>	https://www.genomnis.com/access-hsf
	<i>NNSplice</i>	https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
	<i>MaxEntScan</i>	http://hollywood.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
Frecuencia poblacional	Proyecto 1000 genomas	https://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers
	<i>gnomAD</i>	https://gnomad.broadinstitute.org/
Software de apoyo a decisiones	<i>Varsome</i>	https://varsome.com
	<i>InterVar</i>	http://wintervar.wglab.org/

de la ACMG/AMP del año 2015 (7). Una de ellas es *Varsome*, la cual permite investigar las variantes en su contexto genómico, recoge datos de múltiples bases de datos y aspira a que la comunidad comparta su conocimiento sobre variantes. Incluye información de 30 bases de datos externas que describen más de 500 millones de variantes. Además los resultados no se limitan a variantes conocidas, sino que se puede introducir cualquier tipo de variante en formato HGVS o localización genómica y permite modificar manualmente aquellos criterios dependientes de la familia (41). Otro *software* similar al anterior que clasifica las variantes según las guías ACMG/AMP es *InterVar* (42).

Por parte del laboratorio clínico se pueden realizar distintos estudios para profundizar en la interpretación de determinadas variantes:

- *Estudios funcionales*. Los estudios funcionales son un conjunto de experimentos *in vivo* o *in vitro* que intentan dilucidar las consecuencias que tiene una determinada variante en la función de la proteína. Son una herramienta poderosa para determinar el

efecto deletéreo de la variante, pero no todos son efectivos para determinar el impacto sobre el gen o la funcionalidad de la proteína. La evidencia es mayor si el ensayo refleja la totalidad de la función biológica de la proteína comparada con solo una parte de esta función. Los estudios funcionales que determinan el impacto de las variantes a nivel de mRNA pueden ser altamente informativos a la hora de evaluar los efectos en la estabilidad del mRNA, su procesamiento y traducción entre otros (7).

- *Estudio de cosegregación*. Consisten en analizar la variante hallada en otros miembros de la familia afectados y no afectados. Si la variante está presente en los familiares afectados y ausente en los no afectados, se podría afirmar que la variante cosegrega con la enfermedad. Sin embargo, se debe tener precaución a la hora de usar la cosegregación para clasificar clínicamente una variante, ya que esta evidencia una relación entre el *locus* y la enfermedad pero no confirma la patogenicidad de la variante en sí. Además, se debe tener en cuenta la presencia de posibles fenocopias o de que la cose-

gregación se deba a un desequilibrio de ligamiento con la verdadera variante patogénica. Por otro lado, en casos de enfermedades como el SCMOH, en las que la penetrancia es incompleta o dependiente de la edad, hay que valorar la posibilidad de que existan familiares asintomáticos. Actualmente, también se debe profundizar en la relación biológica entre familiares, ya que existe la posibilidad de no paternidad biológica (donación de espermatozoides u ovocitos o adopción, principalmente).

Estos estudios no están disponibles en todos los laboratorios de genética ni pueden realizarse con todas las variantes halladas en los estudios genéticos. Una posible estrategia para optimizar su utilidad podría ser aplicarlos solo a aquellas variantes con un alto riesgo de afectar al *splicing* según las herramientas *in silico* consultadas (estudios de cDNA tras RT-PCR) y/o las que hayan sido priorizadas previamente.

ASESORAMIENTO GENÉTICO DE LAS VARIANTES CON SIGNIFICADO DESCONOCIDO Y VARIANTES CON SIGNIFICADO DESCONOCIDO PRIORIZADAS

El hallazgo de VUS, tanto las que se encuentran en genes con una conocida implicación en la enfermedad como aquellas que se encuentran en genes para los que su relación con la misma es solo potencial, supone un problema tanto para los profesionales encargados de realizar el asesoramiento genético como para los pacientes receptores de dicha información. Es esencial que durante el asesoramiento genético pre-test se informe correctamente de los posibles resultados que se van a obtener y que sea el paciente, de manera autónoma, quien decida si quiere que se realice dicho análisis. Disponer de información sobre las VUS encontradas puede generar estrés tanto para el individuo como para su familia, que en ocasiones deberá realizarse el estudio de cosegregación. En este caso, siguiendo los principios éticos de privacidad y confidencialidad, será siempre el paciente el que decida si quiere informar a sus familiares de los hallazgos del análisis (43,44).

Según las recomendaciones de expertos y la declaración europea de consenso publicadas recientemente (43), se recomienda informar las VUS halladas en *BRCA1/2* o en otros genes, aunque puntualiza que las VUS halladas en genes de alto riesgo tendrían una mayor importancia clínica que las halladas en genes de bajo riesgo. Sin embargo, esta información no debe usarse en la toma de decisiones clínicas o para análisis predictivo. Se recomienda que el asesoramiento genético siempre quede abierto a la posibilidad de que individuos ya analizados puedan ser contactados en el caso de que aparezca nueva información que afecte a la clasificación de alguna variante en particular, por lo que sería interesante realizar un seguimiento de los portadores de VUS hallados en los estudios genéticos, especialmente de aquellos casos índice en los que se encontró una VUS priorizada (43).

CONCLUSIONES

- El desarrollo y evolución de diferentes guías de clasificación clínica de variantes ha permitido que el proceso diagnóstico del SCMO sea más estandarizado y sistemático, aunque sigue existiendo un gran número de variantes clasificadas como VUS que tiende a aumentar al incrementarse el número de genes estudiados.
- Los algoritmos de priorización de VUS pretenden seleccionar aquellas variantes con potencial deletéreo, en las que se realizará un estudio más pormenorizado para determinar su efecto clínico. Esta priorización se realizará en función de la evidencia clínica de los genes estudiados, así como del resultado de las herramientas web de predicción de patogenicidad utilizadas.
- Es necesario realizar un correcto asesoramiento genético pre-test que permita al paciente entender las posibles consecuencias del estudio, para que decida libremente si desea que se realice dicho análisis.
- Dado que la clasificación de variantes es dinámica, se recomienda realizar un seguimiento de los portadores de VUS, sobre todo de los portadores de VUS priorizadas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Asociación Española del Laboratorio Clínico que me otorgara la beca post-residencia que me ha permitido desarrollar esta revisión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017;151:1-32. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.07.002
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2018;68:394-424. DOI: 10.3322/caac.21492
3. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España (citado 4 Dic 2020). Disponible en: <https://seom.org/dmcan-cer/cifras-del-cancer/>
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359-386. DOI: 10.1002/ijc.29210
5. Freimund AE, Beach JA, Christie EL, Bowtell DDL. Mechanisms of Drug Resistance in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2018;32:983-96. DOI: 10.1016/j.hoc.2018.07.007
6. Llort G, Chirivella I, Morales R, Serrano R, Sanchez AB, Teulé A, et al. SEOM clinical guidelines in Hereditary Breast and ovarian cancer. *Clin Transl Oncol* 2015;17:956-61. DOI: 10.1007/s12094-015-1435-3
7. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-24. DOI: 10.1038/gim.2015.30

8. Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho Y-Y, et al. Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med* 2017;19:1105-17. DOI: 10.1038/gim.2017.37
9. Bonache S, Esteban I, Moles-Fernández A, Tenés A, Duran-Lozano L, Montalban G, et al. Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian cancer Spanish families and clinical actionability of findings. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018;144:2495-513. DOI: 10.1007/s00432-018-2763-9
10. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR, et al. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genet Med* 2008;10:294-300. DOI: 10.1097/GIM.0b013e31816b5cae
11. Lindor NM, Goldgar DE, Tavtigian SV, Plon SE, Couch FJ. BRCA1/2 sequence variants of uncertain significance: a primer for providers to assist in discussions and in medical management. *Oncologist* 2013;18:518-24. DOI: 10.1634/theoncologist.2012-0452
12. Thompson BA, Spurdle AB, Plazzer J-P, Greenblatt MS, Akagi K, Al-Mulla F, et al. Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. *Nat Genet* 2014;46:107-15. DOI: 10.1038/ng.2854
13. Mucaki EJ, Caminsky NG, Perri AM, Lu R, Laederach A, Halvorsen M, et al. A unified analytic framework for prioritization of non-coding variants of uncertain significance in heritable breast and ovarian cancer. *BMC Med Genomics* 2016;9:19. DOI: 10.1186/s12920-016-0178-5
14. Caminsky NG, Mucaki EJ, Perri AM, Lu R, Knoll JHM, Rogan PK. Prioritizing Variants in Complete Hereditary Breast and Ovarian Cancer Genes in Patients Lacking Known BRCA Mutations. *Hum Mutat* 2016;37:640-52. DOI: 10.1002/humu.22972
15. Daly MB, Pilarski R, Yurgelun MB, Berry MP, Buys SS, Dickson P, et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 1.2020: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2020;18:380-91. DOI: 10.6004/jnccn.2020.0017
16. Gabaldó Barrios X, Sarabia Meseguer MD, Marín Vera M, Sánchez Bermúdez AI, Macías Cerrolaza JA, Sánchez Henarejos P, et al. Molecular characterization and clinical interpretation of BRCA1/BRCA2 variants in families from Murcia (south-eastern Spain) with hereditary breast and ovarian cancer: clinical-pathological features in BRCA carriers and non-carriers. *Fam Cancer* 2017;16:477-89. DOI: 10.1007/s10689-017-9985-x
17. Sheikh A, Hussain SA, Ghori Q, Naeem N, Fazil A, Giri S, et al. The spectrum of genetic mutations in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:2177-85.
18. Blanco A, de la Hoya M, Osorio A, Diez O, Miramar MD, Infante M, et al. Analysis of PALB2 gene in BRCA1/BRCA2 negative Spanish hereditary breast/ovarian cancer families with pancreatic cancer cases. *PLoS ONE* 2013;8:e67538. DOI: 10.1371/journal.pone.0067538
19. Gracia-Aznarez FJ, Fernandez V, Pita G, Peterlongo P, Dominguez O, de la Hoya M, et al. Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles. *PLoS ONE* 2013;8:e55681. DOI: 10.1371/journal.pone.0055681
20. Desmond A, Kurian AW, Gabree M, Mills MA, Anderson MJ, Kobayashi Y, et al. Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment. *JAMA Oncol* 2015;1:943-51. DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.2690
21. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, Patel G, Kidd J, Brown KL, et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer* 2017;123:1721-30. DOI: 10.1002/cncr.30498
22. Manahan ER, Kuerer HM, Sebastian M, Hughes KS, Boughey JC, Euhus DM, et al. Consensus Guidelines on Genetic Testing for Hereditary Breast Cancer from the American Society of Breast Surgeons. *Ann Surg Oncol* 2019;26:3025-31. DOI: 10.1245/s10434-019-07549-8
23. Daly MB, Pilarski R, Berry M, Buys SS, Farmer M, Friedman S, et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2017. *J Natl Compr Canc Netw* 2017;15:9-20.
24. ClinVar (Internet). ClinVar (citado 2 Nov 2020). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
25. Sherry ST, Ward M-H, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001;29:308-11.
26. HGMD (Internet). Human Gene Mutation Database (citado 8 Feb 2021). Disponible en: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php.home>
27. LOVD (Internet). An Open Source DNA variation database system (citado 30 Oct 2020). Disponible en: <http://www.lovd.nl/3.0/home>
28. LitVar-NCBI-NLM-NIH (Internet). U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information (citado 4 Dic 2020). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/LitVar/>
29. PolyPhen-2 (Internet). Prediction of functional effects of human nsSNPs (citado 4 Dic 2020). Disponible en: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
30. Sim N-L, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res* 2012;40:W452-7. DOI: 10.1093/nar/gks539
31. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014;11:361-2. DOI: 10.1038/nmeth.2890
32. Align GVGD (Internet). Huntsman Cancer Institute University of Utah Align GVGD (citado 4 Dic 2020). Disponible en <http://agvgd.hci.utah.edu/>
33. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 1974;185:862-4.
34. Cooper GM, Stone EA, Asimenos G, NISC Comparative Sequencing Program, Green ED, Batzoglou S, et al. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res* 2005;15:901-13. DOI: 10.1101/gr.3577405
35. Garber M, Guttman M, Clamp M, Zody MC, Friedman N, Xie X. Identifying novel constrained elements by exploiting biased substitution patterns. *Bioinformatics* 2009;25:i54-62. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp190
36. Pollard KS, Hubisz MJ, Rosenbloom KR, Siepel A. Detection of non-neutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res* 2010;20:110-21. DOI: 10.1101/gr.097857.109
37. Pertea M, Lin X, Salzberg SL. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res* 2001;29:1185-90.
38. Umd.be (Internet). Human Splicing Finder (citado 4 Dic 2020). Disponible en <https://www.genomnis.com/access-hsf>
39. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 1997;4:311-23. DOI: 10.1089/cmb.1997.4.311
40. Yeo G, Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 2004;11:377-94. DOI: 10.1089/1066527041410418
41. Varsome.com (Internet). Varsome The Human Genomics Community (citado 4 Feb 2020). Disponible en: <https://varsome.com/>
42. Li Q, Wang K. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *The American Journal of Human Genetics* 2017;100:267-80. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.01.004
43. Singer CF, Balmaña J, Bürki N, Delalage S, Filieri ME, Gerdes A-M, et al. Genetic counselling and testing of susceptibility genes for therapeutic decision-making in breast cancer - an European consensus statement and expert recommendations. *Eur J Cancer* 2019;106:54-60. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.10.007
44. Gronowski AM, Budelier MM, Campbell SM. Ethics for Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2019;65:1497-507. DOI: 10.1373/clinchem.2019.306670
45. Tavtigian SV, Chenevix-Trench G. Growing recognition of the role for rare missense substitutions in breast cancer susceptibility. *Biomark Med* 2014;8:589-603. DOI: 10.2217/bmm.13.143



Revisión

La metabolómica como herramienta hacia la medicina personalizada en diabetes *mellitus* tipo 2

Metabolomics as a tool towards personalized medicine in type 2 diabetes mellitus

Mariam Cortés Tormo¹, José Vicente Marcos Tomás², Vicente Giner Galvañ³ y Josep Redón i Mas⁴

¹Departamento de Análisis Clínicos. Hospital General de Almansa. Almansa, Albacete. ²Unidad de Enfermedades Metabólicas. Departamento de Análisis Clínicos. Hospital Universitario i Politècnic La Fe. Valencia. ³Unidad de Hipertensión y Riesgo Cardiometabólico. Departamento de Medicina Interna. Hospital Universitario San Juan de Alicante. San Juan de Alicante, Alicante. ⁴Departamento de Medicina Clínica. Facultad de Medicina. Universidad Miguel Hernández. Elche, Alicante. ⁵Unidad de Hipertensión y Riesgo Cardiometabólico. Departamento de Medicina Interna. Hospital Clínico de Valencia. Departamento de Medicina Clínica. Universidad de Valencia. Valencia

Recibido: 20/10/2020
Aceptado: 02/01/2021

Correspondencia: Mariam Cortés Tormo. Departamento de Análisis Clínicos. Hospital General de Almansa. Avda. Circunvalación, s/n. 02640 Almansa, Albacete
e-mail: desampact@hotmail.com

Palabras clave:

Metabolómica. Diabetes tipo 2.
Enfermedad cardiovascular. Enfermedad renal.

RESUMEN

La metabolómica es una de las nuevas “disciplin-ómicas” incorporadas para el estudio fisiopatológico de distintas enfermedades. En esta revisión se resaltan las características principales que la definen, las metodologías e instrumentación empleadas para su desarrollo y las principales utilidades que proceden de los resultados obtenidos.

La diabetes *mellitus* tipo 2 es una patología que se caracteriza por presentar un continuo disglucémico que en fases tempranas se caracteriza por ser asintomático. Además, se engloba dentro de la definición de enfermedad multifactorial, junto con la patología cardiovascular y la enfermedad renal crónica. La medicina personalizada en este tipo de patologías es el futuro para poder abordar el manejo de los pacientes de manera individualizada.

Los resultados obtenidos en distintos estudios nos muestran la metabolómica como la herramienta que nos va a permitir abarcar todas las etapas que se producen en las distintas patologías: desde la predicción del riesgo, hasta, una vez diagnosticadas, la elección de terapias y el seguimiento

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00053

Cortés Tormo M, Marcos Tomás JV, Giner Galvañ V, Redón i Mas J. La metabolómica como herramienta hacia la medicina personalizada en diabetes *mellitus* tipo 2. Rev Med Lab 2021;2(1):30-40

de las mismas, permitiendo además personalizar estrategias de prevención y tratamiento de los pacientes afectados, según sus características individuales.

El aumento de publicaciones basadas en la metabolómica hace interesante difundir las bases, los planteamientos y los recursos que ofrece para obtener una alternativa a la hora de plantear enfoques de investigación, incluso, en ambientes alternativos a los grandes centros de producción científica.

Keywords:

Metabolomics. Type 2 diabetes.

Cardiovascular disease. Chronic kidney disease.

ABSTRACT

Metabolomics is one of the new “disciplinomics” incorporated for the pathophysiological study of different diseases. This review highlights the main characteristics that define it, the methodologies and instrumentation used for its development and the main utilities that come from the results obtained.

Type 2 diabetes *mellitus* is a pathology characterized by presenting a dysglycemic continuum, which in early stages is characterized by being asymptomatic. In addition, it is included within the definition of multifactorial disease, together with cardiovascular disease and chronic kidney disease. Personalized medicine in this type of pathology is the future able to address the management of patients in an individualized way.

The results obtained in different studies show us metabolomics as the tool that will allow us to cover all the stages that occur in the different pathologies: from the prediction of risk, until, once diagnosed, the choice of therapies and follow-up, allowing also to personalize prevention and treatment strategies of affected patients, according to their individual characteristics.

The increase in publications based on metabolomics makes it interesting to disseminate the bases, approaches and resources it offers in order to obtain an alternative when proposing research approaches, even in environments that are alternative to large centers of scientific production.

INTRODUCCIÓN

La diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) se puede considerar como uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, entre otras razones por su elevada prevalencia, su alto coste económico y el número de complicaciones y muertes prematuras que provoca (1,2). Según la Federación Internacional de Diabetes (IDF) a finales de la década pasada aproximadamente el 6 % de la población mundial (425 millones de personas entre 20-79 años) eran diabéticos, estimando que el número de personas con esta enfermedad llegará a 629 millones, un incremento del 48 %, en el año 2045 (3).

Sorprende que a pesar de tratarse de un proceso muy complejo desde el punto de vista de su patofisiología, su definición fenotípica sea tan pobre. De la necesidad de mejores definiciones nosológicas da cuenta la enorme variabilidad interindividual en la evolución y respuesta terapéutica.

Es esperable que un abordaje más individualizado basado en mecanismos patofisiológicos y no meramente clínicos, redunde en mejores resultados consecuencia de un diagnóstico precoz y medidas farmacológicas

ajustadas al perfil de cada caso. Para lo cual, la metabolómica se postula como nueva metodología facilitadora de dicho enfoque.

PATOFISIOLOGÍA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

El continuo disglucémico

Patofisiológicamente, el fenómeno inicial que conduce a la DM2 es la resistencia a la insulina (RI) consecuencia de defectos en la señalización celular de dicha hormona en ciertos tejidos periféricos (hepático, muscular esquelético y adiposo), pudiendo manifestarse con distintos grados. El aumento progresivo de la RI promueve la producción pancreática de insulina como mecanismo compensatorio de la tendencia a la hiperglucemia. Esta hipersecreción insulínica termina provocando el fallo generalizado y apoptosis de la célula β -pancreática (4) así como hiperinsulinismo. Todo ello es consecuencia de la combinación de una serie de factores genéticos predisponentes (2,5) sobre los

que impactan distintos factores ambientales (estilo de vida occidental, dietas ricas en grasas y sedentarismo) como desencadenantes del proceso (2,6) en un continuo progresivo de deterioro del control del metabolismo glucídico que podemos denominar "continuo disglucémico" cuya fase final es la hiperglucemia franca como expresión principal, aunque no única, de la diabetes *mellitus*.

Desde un punto de vista clínico, partiendo de la RI, el espectro fenotípico del continuo disglucémico comprende formas previas a la diabetes como son la glucemia alterada en ayunas (GAA) y la tolerancia alterada a glucosa (TAG), que se engloban en la denominada prediabetes. Estas entidades reflejan la incapacidad creciente de la célula β -pancreática en responder a los estímulos glucémicos a lo largo de la historia natural de la progresión desde la normoglucemia a la DM2 (6), y se caracterizan por la ausencia de manifestaciones que adviertan de su existencia.

La DM2 se caracteriza por un largo periodo temporal asintomático de RI, hiperinsulinemia compensadora y grados variables de elevación moderada de la glucosa plasmática, asociados a un aumento del riesgo cardiovascular y a la aparición de enfermedad vascular, antes del diagnóstico, consecuencia del impacto negativo de la hormona sobre el endotelio de distintos órganos diana, tanto a nivel macro como microvascular (6). Por el papel central de la insulina a nivel de distintas vías metabólicas, el hiperinsulinismo induce, en sujetos pre-

dispuestos genéticamente, el desarrollo de obesidad, dislipemia e hipertensión arterial, reconocidos factores de riesgo cardiovascular. A la asociación observada entre riesgo vascular y RI se le denomina síndrome metabólico (SM) (6). La expresión paucisintomática de la DM2 expone al paciente a un riesgo cardiometabólico incrementado que provoca daño a nivel del corazón, los vasos sanguíneos, los riñones, los ojos y el sistema nervioso periférico tras décadas de esta exposición (7,8).

Como se observa en la figura 1, son varios los mecanismos fisiopatológicos en los que se apoya el concepto de "continuo disglucémico" a través del espectro glucemia alterada y enfermedad cardiovascular (ECV) (6).

La aparición de ECV en sujetos con RI no tratada y aquellos con DM2, es un proceso progresivo cuyos cambios ocurren en un periodo de 20-30 años y se producen en paralelo a una serie de anomalías moleculares en las que el incremento progresivo de la RI y el hiperinsulinismo compensatorio asociado son cruciales (6).

Factores genéticos y metabólicos implicados en la diabetes *mellitus* tipo 2

Aunque existen marcadores genéticos que se han asociado al desarrollo de DM2, en la mayoría de casos

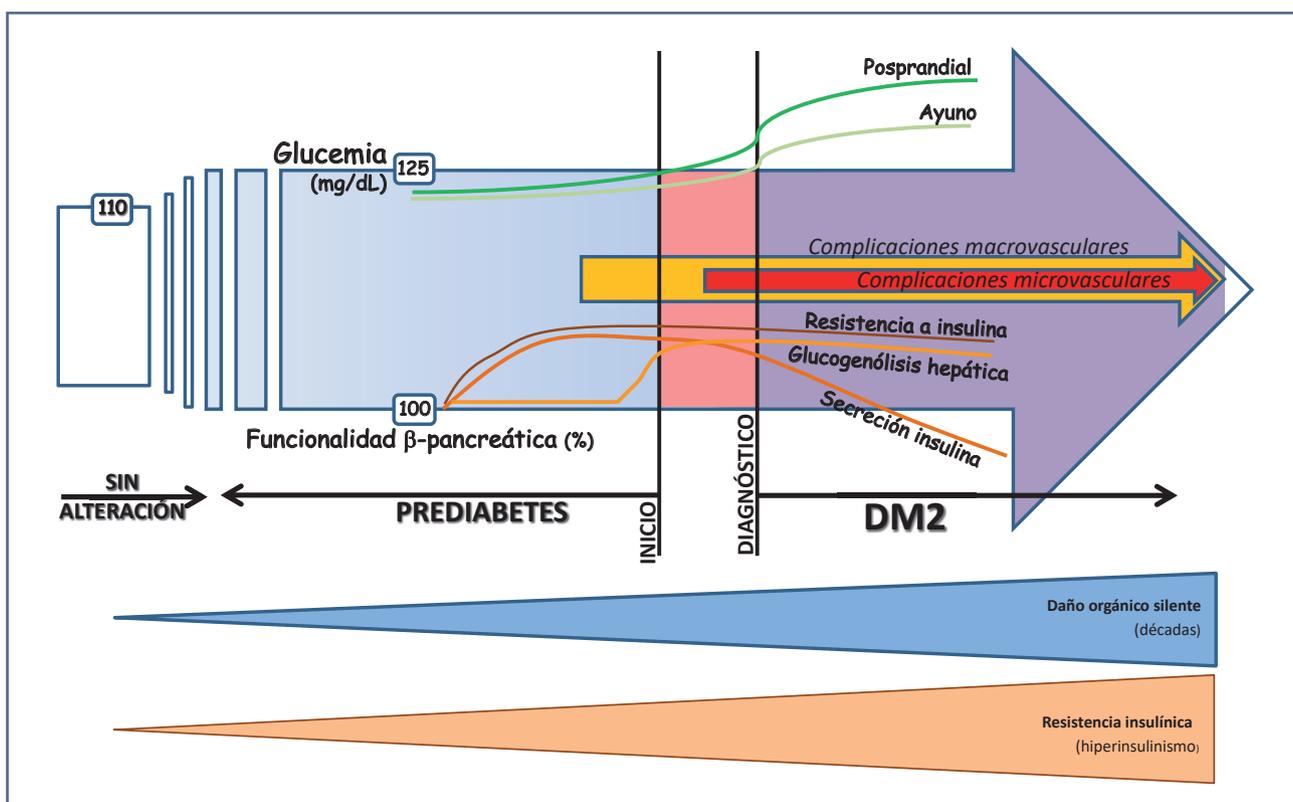


Figura 1 – Continuo disglucémico y ECV. La flecha indica la evolución desde el estado de normoglucemia al estado de DM2, en paralelo con alteraciones en la glucemia y las distintas implicaciones que conlleva dicho proceso (6).

la herencia es poligénica, lo que dificulta la obtención de marcadores genéticos de riesgo (2). La *Genome Wide Association* (GWAS) ha realizado un catálogo con los *loci* genéticos relacionados con el desarrollo de DM2 en el que se incluyen más de 100 variantes, sin embargo, estas variantes genéticas solo explican una fracción inesperadamente pequeña (< 15 %) de la herencia estimada (9). Como otros marcadores genéticos de riesgo se han identificado alrededor de 60 SNPs (*single nucleotide polymorphism*) (10-12), muchos de ellos relacionados con la biología de las células β -pancreáticas y patologías asociadas como la obesidad (13), lo que refrenda la estrecha relación patofisiológica entre los distintos componentes constitutivos del síndrome metabólico (14).

Estudios realizados con sistemas de integración de datos moleculares específicos de tejido han revelado algunos procesos y mecanismos que relacionan tejido y enfermedad, como la fosforilación oxidativa en hígado y tejido adiposo, la oxidación de ácidos grasos, la señalización de los PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*) y la diferenciación de células adiposas en RI, DM2 y obesidad, y el ciclo de regulación celular específico de islote pancreático en DM2 (15). Las rutas metabólicas que se encuentran afectadas por la insulina coinciden con algunas de las descritas anteriormente, siendo las más conocidas el metabolismo de la glucosa, el de los aminoácidos, el de los lípidos y el ciclo de Krebs (16). En esta línea, se han identificado varios sistemas claves en el control de las enzimas que modulan la homeostasis energética celular, cuya alteración podría verse implicada en la génesis de la DM2: la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK), los PPAR, la leptina y la adiponectina. Sistemas cuyo comportamiento responde a factores ambientales, además de genéticos (17).

La AMPK es un sensor del estado nutricional y metabólico de la célula relacionado con la estimulación de la oxidación de los ácidos grasos al fosforilar a la acetil-CoA carboxilasa (ACC), lo cual intensifica la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria (17,18). Las hormonas secretadas por el tejido adiposo, leptina y adiponectina activan la AMPK tanto en el tejido adiposo como en los tejidos periféricos, incluyendo el músculo esquelético e hígado, aumentando el consumo de energía. A su vez, la activación de la AMPK inicia la activación de los PPAR- γ , que promueven la expresión de enzimas que participan en la oxidación de ácidos grasos (17) (Fig. 2).

Los PPAR- γ pertenecen a una amplia familia de receptores nucleares que actúan como activadores de la transcripción y se expresan principalmente en el tejido adiposo, habiéndose descrito un polimorfismo del gen de PPAR- γ que confiere resistencia a desarrollar DM2. De forma coherente, los portadores de este polimorfismo presentan niveles elevados de adiponectina, mientras que los no portadores, presentan niveles bajos (17), objetivándose niveles bajos en sujetos obesos, con RI, DM2 o dislipemia. La expresión de la adiponectina se

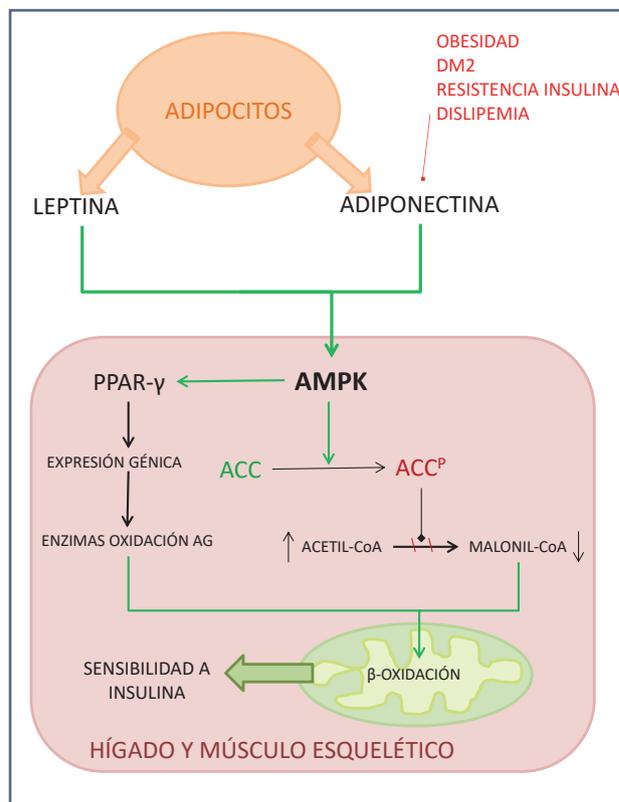


Figura 2 – Estimulación de AMPK a través de adiponectina y leptina. Tras la activación de AMPK se activa PPAR y se fosforila ACC (ACC^P) quedando inactiva. Esto provoca un aumento de la β -oxidación de ácidos grasos y una serie de reacciones en hígado y músculo que favorecen la sensibilidad a la insulina, evitando el desarrollo de DM2 (PPAR: receptor de activación de factores de proliferación peroxisomal; AMPK: proteína cinasa dependiente de AMP; ACC: acetil-CoA carboxilasa).

incrementa por los agonistas de los PPAR, mientras que el TNF- α y la interleucina 6 la inhiben (17) (Fig. 2).

Asimismo, se ha relacionado el gen de la leptina con el desarrollo posterior de obesidad y DM2. La leptina es sintetizada principalmente por el tejido adiposo y su sobreexpresión reduce la expresión de ACC, enzima clave en la síntesis de ácidos grasos. La leptina también puede inhibir la lipogénesis en hígado, islotes pancreáticos y en tejido adiposo y estimular la oxidación de ácidos grasos. Este mecanismo involucra la estimulación directa de la AMPK, la cual, al fosforilarse, inhibe a la ACC (17) (Fig. 2).

En el complejo esquema de relaciones que ilustra la figura 2, es evidente que el punto de regulación de la síntesis y la oxidación de ácidos grasos en los adipocitos representa un punto estratégico en la patofisiología de desórdenes metabólicos relacionados a través de distintas vías como la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico (SM) (17).

Por otro lado, la hiperglucemia y la DM2 están directamente relacionadas con la producción elevada de especies reactivas de oxígeno (ROS) y bajos niveles de ATP, lo que genera un cambio en el estado redox y la homeos-

tasis celular, desencadenando disfunción mitocondrial (18) que a su vez contribuye al desarrollo de RI dependiente de la edad (6). La biogénesis de las mitocondrias contribuye a regular el balance energético, y se cree que una mayor producción de ROS por la cadena de transporte de electrones, en condiciones de hiperglucemia, exacerba la alteración de las vías metabólicas, lo que conduce a complicaciones microvasculares (nefropatía, retinopatía y neuropatía) y complicaciones macrovasculares (ictus e isquemia de miocardio), incluso después de que se normalice la concentración de glucosa (6,18). Según el grupo de You y cols., la hormesis mitocondrial en la DM2 implica una reducción de la producción de ROS y una reducción de la síntesis de ATP en diferentes tejidos en respuesta a niveles altos de glucosa (19). Este efecto puede activar sirtuína 1/3 (SIRT1/3), AMPK y PGC-1 α (coactivador 1 α de PPAR- γ), restaurando así la función mitocondrial y aumentando la sensibilidad a la insulina en las células β , el hígado y el músculo, lo que, a su vez, evita complicaciones vasculares (18). En situaciones de estrés metabólico y oxidativo, debido a que las células β carecen de ciertas enzimas antioxidantes que eliminan las ROS, el aumento de su producción promueve su disfunción y apoptosis (13).

HETEROGENEIDAD FENOTÍPICA Y NECESIDAD DE MEJORES MARCADORES EN DIABETES MELLITUS TIPO 2

Existe una gran variabilidad genotípica y fenotípica en los individuos que desarrollan DM2. La heterogeneidad interindividual y variabilidad entre genoma y fenotipo es consecuencia de complejas variantes de interacción entre los múltiples sistemas biológicos implicados en la génesis de la disglucemia. Contrasta con esta heterogeneidad molecular interindividual la pobreza definitoria del fenotipo que actualmente denominamos DM2, basada en un solo rasgo fenotípico como es la glucemia y una absoluta ausencia de marcadores individuales de evolución o de respuesta terapéutica, por lo que las medidas terapéuticas suelen ser generalizadas a todos los diabéticos, siendo la respuesta a las mismas muy diversa y poco predecible.

El conocimiento de vías moleculares implicadas en la génesis de la DM2 abre un gran abanico de actuación, dirigida en función de la situación en la que se encuentre el paciente a lo largo del continuo disglucémico e incluso según el mecanismo patofisiológico predominante en cada individuo, contemplando potenciales respuestas individuales a cambios en el estilo de vida (20) hasta el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en los distintos mecanismos involucrados en la DM2 y en las patologías subyacentes, como podría ser la inhibición de enzimas clave involucradas en el daño vascular inducido por hiperglucemia o la activación de vías de señalización que mejoren la sensibilidad a la insulina (6).

En este conjunto de patologías multifactoriales nos encontramos con la necesidad de nuevos marcadores moleculares que mejoren nuestra capacidad de mane-

jar de una forma realmente individualizada patologías tan heterogéneas en su expresión fenotípica como es la DM2. Ello permitiría para cada individuo en riesgo un diagnóstico precoz basado en el momento evolutivo patofisiológico de cada uno, facilitando al mismo tiempo establecer dianas terapéuticas individualizadas. Es lo que en la actualidad se viene llamando "Medicina personalizada", y donde el desarrollo de las disciplinas "ómicas" tiene un gran potencial como indicadores para el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en los mecanismos involucrados en el desarrollo de la disglucemia de un individuo concreto. Dentro de estas nuevas estrategias se enmarca la metabolómica.

METABOLÓMICA

Fundamentos de la metabolómica

La metabolómica es la disciplina científica, dentro de las "ómicas", encargada de estudiar los metabolitos, pequeñas moléculas orgánicas (< 1500 Da) que intervienen en los diferentes procesos celulares y que nos revelan cómo está funcionando el metabolismo, desde una célula hasta un ser vivo. El conjunto de estos metabolitos es denominado metaboloma (21,22). Se estima que hay más de 2.000 metabolitos diferentes que son sintetizados de forma endógena además de los metabolitos exógenos, incorporados en la dieta junto con los producidos por la flora intestinal (23). *The Serum Metabolome* es una base de datos gratuita que contiene información detallada sobre los 4651 metabolitos descritos en el suero humano hasta la fecha, integrada en la plataforma *Human Metabolome Database (HMDB)*, donde también podemos encontrar los metabolitos presentes en otros muestras biológicas como pueden ser la orina, la saliva el líquido cefalorraquídeo (LCR), el sudor y las heces (22).

La metabolómica permite estudiar los perfiles metabólicos en muestras biológicas con la finalidad de descubrir en poblaciones con enfermedades o factores de riesgo, biomarcadores más sensibles y específicos que los actualmente disponibles (21,24). Los procesos reguladores en el ADN afectan a la expresión de moléculas de procesos posteriores, como los ARN, las proteínas y los metabolitos. Los efectos de los diferentes elementos reguladores son aditivos. La biología de sistemas intenta analizar las interacciones entre las diferentes entidades moleculares para ofrecer una visión holística de los procesos biológicos y las alteraciones patológicas que se producen en la enfermedad (23). Por esto, a diferencia del genoma, el proteoma y el metaboloma son dinámicos y están mucho más próximos a la expresión fenotípica final de la enfermedad, lo que conceptualmente los dotaría de mayor especificidad (23) (Fig. 3).

El metaboloma integra la información biológica del genoma, el transcriptoma, el proteoma y las reacciones enzimáticas generales de un individuo, lo que permite la detección de cambios fisiológicos o patológicos a corto y largo plazo que conducen a la enfermedad (25).

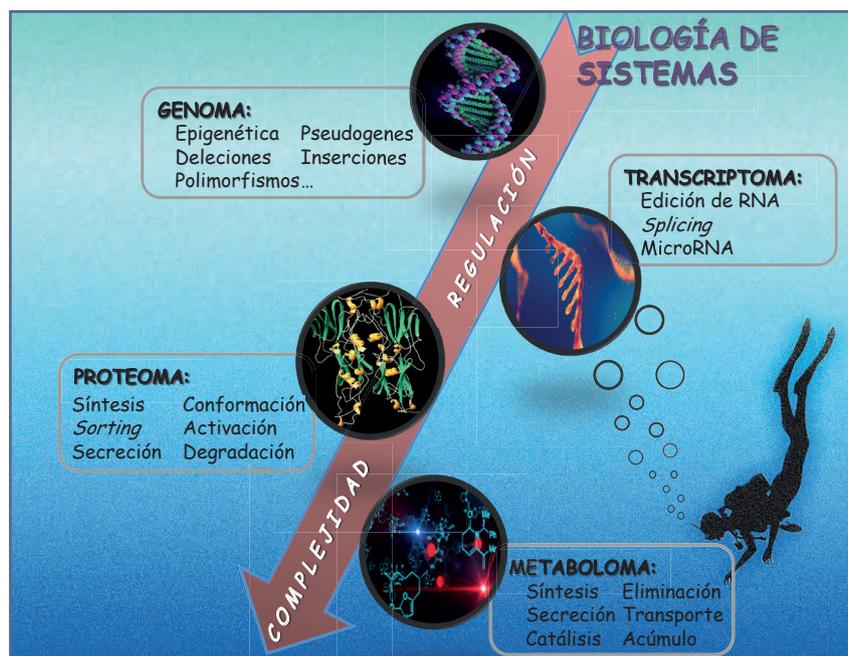


Figura 3 – Biología de sistemas.

Aspectos metodológicos

Las técnicas metabolómicas nos permiten medir simultáneamente un gran número de metabolitos en un único proceso, lo que permite acceder a la detección de un número elevado de biomoléculas simultáneamente, de manera cualitativa o cuantitativa, y además, poder conjugar la información que ofrecen todas ellas paralelamente en un mismo entorno, ya sea fisiológico o patológico. El manejo de esa información facilita la elaboración de algoritmos multiparamétricos que ayudan a evaluar riesgos o establecer pronósticos, permitiendo individualizar la actuación sobre cada proceso al situar a cada paciente dentro de grupos clínicos más precisos que los meramente basados en fenotipos clínicos (23). Estas herramientas también permiten un análisis de datos que proporciona correlaciones a través del metabolismo, demostrando la alta interconectividad y complejidad de las vías metabólicas (26).

Respecto de otras metodologías “clásicas”, la ventaja de la metabolómica es que puede utilizarse para comparaciones de muestras clínicas no sujetas a ninguna hipótesis, lo cual ha sido posible gracias a las mejoras alcanzadas en la sensibilidad y la exactitud de los espectrómetros de masas, al desarrollo de mejores técnicas de separación, junto con nuevos métodos de marcado y la disponibilidad de bases de datos para comparar y analizar series de datos de creciente complejidad (23).

Contamos con tres técnicas para obtener los patrones metabolómicos a partir de muestras como: biofluidos, biopsias y tejidos (27). La espectroscopía basada en la resonancia magnética de protón (H-NMR), que puede detectar, en principio, cualquier sustancia orgánica por la característica de poseer protones. La cromatografía

de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), mediante la cual metabolitos que previamente han sido vaporizados y separados a través de una columna dependiendo del tiempo de vaporización (CG), posteriormente son ionizados, acelerados y, finalmente, identificados espectrométricamente según su relación masa/carga (m/q). Finalmente, la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS), que difiere de la anterior en que los metabolitos se separan de acuerdo a su solubilidad con respecto a la fase móvil líquida y en contra de la fase estacionaria, de distinta polaridad que la fase líquida, que se encuentra en el interior de la columna cromatográfica (24,26,28). Estas técnicas son particularmente apropiadas en patologías como DM2, obesidad y desórdenes relacionados con las mismas, ya que son en su conjunto trastornos poligénicos (26).

En cuanto a las principales diferencias que podemos encontrar entre las distintas técnicas, las más significativas son las encontradas entre H-NMR y MS, ya que sendos métodos son de detección. En la tabla I se muestran las principales diferencias entre ambas metodologías (27).

METABOLÓMICA EN LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

Marcadores metabolómicos de desarrollo de diabetes mellitus tipo 2

Se han relacionado distintas rutas metabólicas que pronostican el desarrollo de DM2, como son las rutas implicadas en el estrés oxidativo, regulación de lípidos o inflamación. Se ha demostrado que existe una reduc-

Tabla I.

Tabla comparativa de la resonancia magnética nuclear de protón (H-NMR) y la espectroscopía de masas (MS) (27)

	H-RMN	MS
Sensibilidad	Menor (nanomolar)	Mayor (picomolar)
Reproducibilidad	Elevada	Moderada
Degradación de la muestra	No	Sí
Accesibilidad a la tecnología	Muy difícil	Difícil
Identificación de metabolitos	Bien categorizada	Compleja

Modificación de la original.

ción de la actividad de los sistemas antioxidantes en suero de sujetos con DM2, como glutatión, vitamina C o vitamina E, entre otros. En cuanto a los marcadores lipídicos se ha demostrado que el aumento de la adiponectina, proteína reguladora del metabolismo de glucosa y lípidos y potenciadora de la acción de la insulina a nivel hepático, se relaciona con una disminución de la incidencia de DM2, mientras que su disminución se asocia con aumento de obesidad. Por último, en cuanto a marcadores inflamatorios, niveles elevados de IL-18 en suero, están relacionados con un aumento en el riesgo de padecer DM2, independientemente del estado inflamatorio general (29).

En un estudio realizado por Gall y cols. (30), se utilizó un enfoque metabolómico no dirigido para identificar los metabolitos plasmáticos asociados con el desarrollo de RI y/o intolerancia a la glucosa. Los dos metabolitos

mejor asociados fueron un ácido orgánico, el α -hidroxibutirato (α -HB) y un fosfolípido, el 1-linoleoil-glicerofosfolina (L-GPC) (30). También el grupo de Ferrannini y cols. (31) propuso los niveles de α -HB y L-GPC en ayunas como nuevos biomarcadores para ayudar a predecir la disglucemia y la DM2 (31). Estos perfiles metabólicos no dirigidos representan una nueva herramienta que permite el estudio exhaustivo del metabolismo y de las redes metabólicas para obtener información sobre el fenotipo e identificar nuevos biomarcadores (32).

En dos estudios acerca de la predicción de desarrollar DM2 realizados por los grupos de Wang y cols. (33) y McKillop y cols. (29), se demuestra la relevancia que tiene el metabolismo de los aminoácidos al principio de la patogénesis de la DM2 y sugiere que ciertos perfiles de aminoácidos, como es el caso de isoleucina, leucina, valina, tirosina y fenilalanina, se relacionan con el riesgo de desarrollar la enfermedad (29,33). Hallazgo confirmado por múltiples estudios posteriores que relacionan niveles elevados de aminoácidos ramificados (BrAA) y aromáticos (ArAA) con individuos que presentan resistencia a la insulina (RI), obesidad y DM2, además de estar relacionados con la predicción de la progresión de la DM2 (32).

Otros dos grupos de investigación realizaron una revisión sistemática para identificar los posibles metabolitos que permitan relacionar DM1 y/o DM2 (34), como es el caso del grupo de Borros y cols. y para identificar los posibles metabolitos que permitan predecir el estado de prediabetes y la DM2 (35), como es el caso del grupo de Guash-Ferré y cols. En sendos estudios se describen distintos compuestos bioquímicos agrupados dentro de aminoácidos, ácidos orgánicos y acilcarnitinas, ácidos grasos, lípidos, hidratos de carbono y cuerpos cetónicos, los cuales ofrecen una visión de cómo se comportan los distintos metabolitos dentro de la patología diabética (34,35). En la tabla II se agrupan los distintos metabolitos, a los que hacen referencia las

Tabla II.

Metabolitos relacionados con DM2, prediabetes y DM1

Metabolitos	DM1	DM2	Prediabetes
Aminoácidos	↑ Aa aromáticos (tirosina y fenilalanina) (34)	↑ Aa aromáticos (tirosina y fenilalanina) (29,33,35)	↑ Aa aromáticos (tirosina y fenilalanina) (29,33,35)
	↑ Aa de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) (34)	↑ Aa de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) (29,33-35)	↑ Aa de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) (29,33,35)
		↑ Ratio glutamato/ glutamina (34,35)	
		↓ Glicina (35)	
		↑ Arginina, citrulina y ornitina (34,35)	↑ Arginina, citrulina y ornitina (35)
Ácidos grasos	↑ Ác. palmítico, ác. esteárico y ác. mirístico (34)	↑ Ác. dodecanoico (34), ác. palmítico, ác. esteárico, ác. mirístico (35)	↑ Ác. palmítico, ác. esteárico y ác. mirístico (35)

(Continúa en la página siguiente)

Tabla II (Cont.) Metabolitos relacionados con DM2, prediabetes y DM1		
Lípidos	↓ Esfingomielina y glicerofosfolípidos (34)	↑ Esfingomielina y glicerofosfolípidos (34) ↓ Esfingomielina y glicerofosfolípidos (35) ↑ Fosfatidilcolina (35) ↓ 1-linoleoil-glicerofosfocolina (30,31) ↓ Alquilfosfatidilcolina (35) ↑ 1-linoleoil-glicerofosfocolina (30,31)
Cuerpos cetónicos		↑ β-OH-butirato, 3-OH-butirato (35) y α-OH-butirato (30,31) ↑ β-OH-butirato, 3-OH-butirato (34) y α-OH-butirato (30,31)
Alcoholes		↓ 1,5 anhidroglucitol (34,35)
Hidratos de carbono		↑ Glucosa, dihexosa, manosa, arabinosa y fructosa (34,35) ↑ Glucosa, dihexosa, manosa, arabinosa y fructosa (35)
Ácidos orgánicos y acilcarnitinas		↑↑ Acilcarnitinas (C2, C3, C6, C8 y C10) (35)
		↑ Ác. acético, dimetil ester y ac. maleico (34,35)
		↓ Propionilcarnitina (35)

revisiones y los estudios mencionados, dentro de cada uno de los posibles estados de la DM y cómo se ven implicados en cada uno de ellos.

En la figura 4 se puede observar las relaciones de los metabolitos plasmáticos citados en los estudios y revisiones anteriores con respecto al desarrollo, la progresión y el riesgo de desarrollar prediabetes y DM2. Se pueden englobar a los metabolitos α-hidroxibutirato, β-hidroxibutirato y 1-linoleoil-glicerofosfocolina (L-GPC) como posibles predictores de prediabetes, apareciendo antes de que se dé la resistencia a la insulina (RI) y la tolerancia alterada a la glucosa (TAG) (30,31). El estado disglucémico de prediabetes ya presenta niveles elevados de aminoácidos de cadena ramificada (BrAA), aminoácidos aromáticos (ArAA) (29,33) y de la relación glutamato/glutamina (Glu/Gln) (34,35). Previa a la instauración del estado disglucémico de DM2, también aumentan los niveles de BrAA, ArAA y β-hidroxibutirato y la relación Glu/Gln (29,33-35), donde además se ha observado una relación entre el aumento de BrAA, ArAA y la RI (32). Una vez instaurada la DM2, se produce un mayor aumento de los metabolitos descritos.

Marcadores metabolómicos de respuesta farmacológica

El manejo de la DM2 es complejo y sus complicaciones siguen siendo una gran carga para los pacientes y para la sociedad en general. Las tasas de respuesta incompleta a la terapia y la disminución de la duración de la respuesta con el tiempo, en la mayoría de los

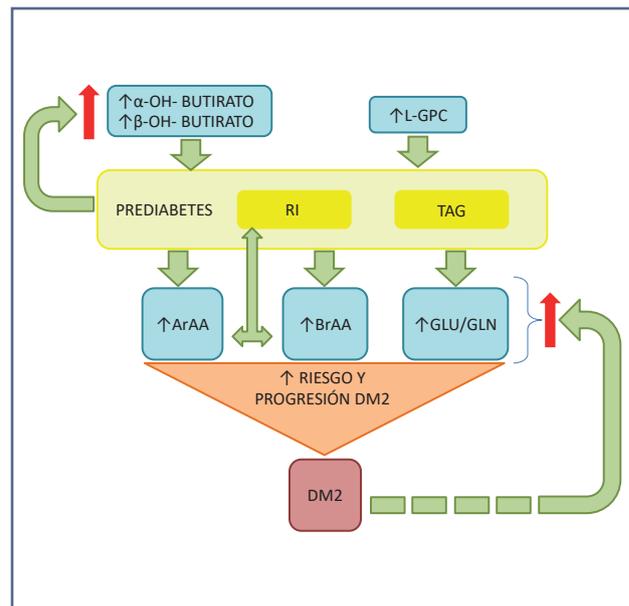


Figura 4 – Metabolitos implicados en el desarrollo, la progresión y el riesgo de la DM2. Los metabolitos α-hidroxibutirato, β-hidroxibutirato y 1-linoleoil-glicerofosfocolina (L-GPC) son predictores de la prediabetes, apareciendo antes de que se dé la resistencia a la insulina (RI) y la tolerancia alterada a la glucosa (TAG) (30,31). El estado de prediabetes ya presenta niveles elevados de aminoácidos de cadena ramificada (BrAA), aminoácidos aromáticos (ArAA) (29,33) y la relación glutamato / glutamina (Glu/Gln) y antes del inicio de la DM2, también aumentan los niveles de BrAA, ArAA y β-hidroxibutirato y la relación Glu/Gln. En la DM2 instaurada, se produce un mayor aumento de los metabolitos descritos (29,33-35).

fármacos antidiabéticos, enfatizan la necesidad de intervenciones personalizadas para mantener un control glucémico adecuado y mantenido en el tiempo (36). Fenómeno significativo en la DM2 es además la pérdida generalizada de respuesta terapéutica a los fármacos en el tiempo, que exhibe perfil dependiente de la familia terapéutica considerada y de cada paciente. Se piensa que la respuesta variable e incompleta al tratamiento es debida, entre otros, a variaciones genéticas que afectan el metabolismo del medicamento. En algunos casos estas variaciones pueden implicar una mayor eficacia al tratamiento, como los pacientes que tienen variantes en el gen que codifica el citocromo P450 2C9 y que tienen un aclaramiento de sulfonilureas disminuido, o como los portadores de ciertas variantes en PPAR- γ , que regula el almacenamiento de ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa, que muestran mayores disminuciones en los niveles de glucosa en sangre y HbA1c, en respuesta a rosiglitazona y pioglitazona, que los no portadores (12).

En el estudio realizado por el grupo de den Ouden y cols. se observaron los cambios producidos en los metabolitos plasmáticos de pacientes con DM2, con una hemoglobina glicosilada (HbA1c) > 6,5 %, durante 5 años de tratamiento con metformina y/o sulfonilureas. Son varios los metabolitos detectados en este estudio, pero los más significativos para definir a la metformina como mejor tratamiento en base a la disminución de la HbA1c en estos pacientes fueron la elevación del ácido 3-OH-butanoico y la disminución de la 2-OH-piperidina y la 4-oxoprolina. Estos metabolitos también se vieron afectados de la misma manera en el tratamiento combinado con metformina y sulfonilureas, mientras que el 1,5 anhidroglucitol se vio significativamente elevado en el tratamiento combinado (36). Estudios con distintos hipoglucemiantes orales nos llevan a pensar que la metabolómica puede ser utilizada como herramienta para identificar potenciales biomarcadores predictores de la respuesta a tratamientos antidiabéticos (36,37).

Predictores metabolómicos de complicaciones crónicas

Según la American Diabetes Association (ADA), la DM2 se considera una ECV de origen metabólico ya que más del 80 % de la morbimortalidad de los diabéticos es de tipo cardiovascular, mientras que menos del 1 % de la mortalidad es atribuible a trastornos derivados del descontrol metabólico (38), de ahí la especial relevancia de contar con marcadores de riesgo de desarrollo de complicaciones individualizables, siendo de marcado interés la detección de predictores de enfermedad renal y su evolución.

En esta línea, Liu y cols. (39) compararon muestras de plasma de 15 controles sanos, 13 pacientes con enfermedad coronaria (EC), 15 pacientes con DM2 y 28 pacientes con DM2 y EC. Se identificaron 11 y 12 metabolitos representativos de EC y DM2 respectivamente, que incluyeron principalmente alanina, arginina,

prolina, glutamina, creatinina y acetato. Los resultados demostraron que con el enfoque metabolómico basado en la H-NMR se obtenía un buen rendimiento para identificar biomarcadores diagnósticos en plasma y que la mayoría de los metabolitos identificados relacionados con la DM2 y la EC podrían considerarse factores predictivos de EC, así como dianas terapéuticas para la prevención (39) (Fig. 5).

En otro estudio se recurrió a la investigación del metaboloma para evaluar la progresión de enfermedad renal crónica (ERC). Rhee y cols. (40) elaboraron perfiles metabolómicos en plasma de 400 pacientes con disfunción renal en un estudio de casos (n = 200) y controles (n = 200). Los casos correspondían a sujetos con una rápida progresión de su enfermedad renal, elegidos al azar entre individuos con deterioro de la función renal progresivo definido como pérdida de TFGe de 3 mL/min/1,73 m²/año o mayor. Los controles correspondían a población con disfunción renal estable en el tiempo definida como aquella con descenso de TFGe inferior a 3 mL/min/1,73 m²/año. Aproximadamente el 50 % de los casos y controles eran diabéticos. Nuevamente se vio que los aminoácidos arginina, metionina y treonina eran indicadores de mal pronóstico de la función renal, encontrándose disminuidos en los pacientes control (40). Son varios los estudios sobre pacientes con distintas patologías renales donde se llega a la conclusión de que la metabolómica es una ciencia prometedora para su diagnóstico temprano, aumentando las posibilidades de la elección de una terapia adecuada, además de permitir la identificación de nuevas rutas metabólicas las cuales pueden estar dirigidas específicamente a la patología renal (41).

CONCLUSIONES

En patologías como la DM2, la enfermedad renal crónica o la enfermedad cardiovascular, con un complejo conjunto de interacciones entre factores ambientales y genética, y en las que se observan múltiples cambios en los perfiles bioquímicos del organismo, la metabolómica nos da la posibilidad de encontrar potenciales marcadores para el diagnóstico y la elección de sus terapias de forma individualizada (29,42). También, a nivel epidemiológico podría servir para la detección de grupos de población normoglucémica pero con riesgo de desarrollar DM2.

Una de las principales carencias de evidencia en el manejo de la DM consiste en la estratificación del riesgo cardiovascular. Los cálculos de riesgo disponibles siguen siendo deficientes en varios niveles, mientras que faltan biomarcadores fiables y rentables. Por lo tanto, el descubrimiento de nuevos biomarcadores es un desafío importante en esta área (43). Por este motivo, el desarrollo de la medicina personalizada va a permitir evaluar los riesgos médicos, monitorizar, diagnosticar y tratar a los pacientes de acuerdo con su composición genética específica y su fenotipo molecular (44).

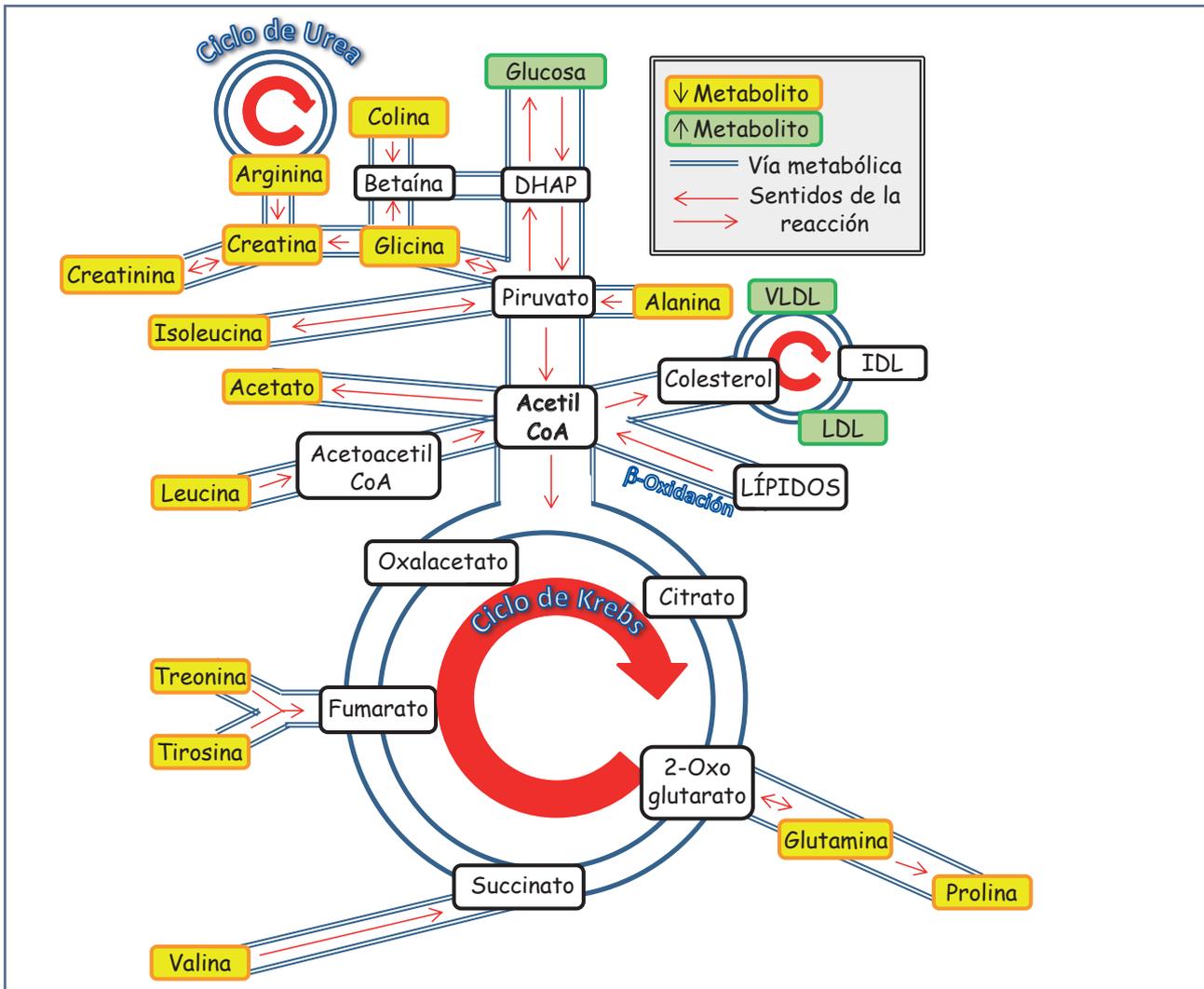


Figura 5 – Rutas metabólicas alteradas y detectadas por el análisis de H-NMR donde se muestra la relación existente entre los metabolitos de las rutas metabólicas identificadas y riesgo de desarrollo de EC en la DM2. Los metabolitos en amarillo corresponden a los que se ven disminuidos mientras que los metabolitos en verde corresponde a los que se ven aumentados. Las flechas en rojo representan la dirección de la reacción (39).

La metabolómica, a nivel clínico y epidemiológico, proporciona una oportunidad única para poder observar de una forma más global las relaciones entre el genotipo y el fenotipo, así como las respuestas de un organismo en relación con los factores ambientales. Fundamentalmente, proporciona información sobre los factores que influyen en las enfermedades, permitiendo entender su patogénesis, obtener un diagnóstico temprano, una terapia adecuada y la monitorización de la misma (29). Además, permite acceder a la elaboración y perfeccionamiento de estos perfiles y, aunque hasta ahora su uso no ha conseguido una mejora sustancial en la evaluación del riesgo de padecer DM2, ya que se necesita un elevado número de datos multiparamétricos para una correcta evaluación del riesgo en el caso de una patología multifactorial, sí nos permite progresar en el conocimiento de la patología y realizar nuevos enfoques que puedan llevarnos hasta

nuevos y efectivos biomarcadores de riesgo en un futuro intermedio (45). Seguramente, este análisis de datos multivariantes es la principal limitación que tienen los estudios metabolómicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cases MM. Coste actual de la diabetes mellitus en España: el estudio eCostesDM2. Suplemento extraordinario Diabetes Práctica 2013:6.
2. Ruiz-Ramos M, Escolar-Pujolar A, Mayoral-Sánchez E, Corral-San Laureano F, Fernández-Fernández I. La diabetes mellitus en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades. Gaceta Sanitaria 2006;20:15-24.
3. International Diabetes Federation (IDF). Diabetes Atlas. 8th edition. 2017; Available from: www.diabetesatlas.org; 2017.
4. Berlanga E, Casamitjana R. Estudio de la función pancreática endocrina en el laboratorio clínico. SEQC; 2004.

5. DiStefano JK, Watanabe RM. Pharmacogenetics of anti-diabetes drugs. *Pharmaceuticals* 2010;3(8):2610-46.
6. Rydén L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, et al. Guía de práctica clínica de la ESC sobre diabetes, prediabetes y enfermedad cardiovascular, en colaboración con la European Society for the Study of Diabetes. *Rev Esp Cardiol* 2014;67(2).
7. Jakab Z. Data and statistics DM. Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/diabetes/data-and-statistics>.
8. Giner V, Coca A, de La Sierra A. Increased insulin resistance in salt sensitive essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2001;15(7):481-5.
9. Yengo L, Arredouani A, Marre M, Rousset R, Vaxillaire M, Falchi M, et al. Impact of statistical models on the prediction of type 2 diabetes using non-targeted metabolomics profiling. *Molecular Metabolism* 2016;5(10):918-25.
10. Watanabe RM. Drugs, diabetes and pharmacogenomics: the road to personalized therapy. *Pharmacogenomics* 2011;12(5):699-701.
11. Mihaescu R, Meigs J, Sijbrands E, Janssens AC. Genetic risk profiling for prediction of type 2 diabetes. *PLoS Curr* 2011;3:RRN1208.
12. Johansen Taber KA, Dickinson BD. Genomic-based tools for the risk assessment, management, and prevention of type 2 diabetes. *Appl Clin Genet* 2015;8:1-8.
13. Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, et al. β -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(6):1983-92.
14. Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2017;11(8):215-25.
15. Meng Q, Mäkinen V, Luk H, Yang X. Systems biology approaches and applications in obesity, diabetes, and cardiovascular diseases. *Current Cardiovascular Risk Reports* 2013;7(1):73-83.
16. Dutta T, Chai HS, Ward LE, Ghosh A, Persson XM, Ford GC, et al. Concordance of changes in metabolic pathways based on plasma metabolomics and skeletal muscle transcriptomics in type 1 diabetes. *Diabetes* 2012;61(5):1004-16.
17. Aguilera KGC, Sánchez SC. Señales Moleculares que modulan el metabolismo energético: implicaciones en el desarrollo de obesidad, diabetes y cardiopatías. *Facultad de medicina UNAM: Mensaje Bioquímico Edit*; 2009.
18. Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Hernandez-Mijares A, Rocha M, Victor VM. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: pathophysiological implications. *Redox biology* 2017;11:637-45.
19. You YH, Quach T, Saito R, Pham J, Sharma K. Metabolomics Reveals a Key Role for Fumarate in Mediating the Effects of NADPH Oxidase 4 in Diabetic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2016;27(2):466-81.
20. Langenberg C, Sharp SJ, Franks PW, Scott RA, Deloukas P, Forouhi NG, et al. Gene-lifestyle interaction and type 2 diabetes: the EPIC interact case-cohort study. *PLoS Medicine* 2014;11(5):e1001647.
21. Sirolli V, Rossi C, Di Castelnuovo A, Felaco P, Amoroso L, Zucchelli M, et al. Toward personalized hemodialysis by low molecular weight amino-containing compounds: future perspective of patient metabolic fingerprint. *Blood Transfus* 2012;10(Suppl 2):s78-88.
22. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, et al. The human serum metabolome. *PLoS one* 2011;6(2):e16957.
23. Barallobre-Barreiro J, Chung Y, Mayr M. La proteómica y la metabolómica: los mecanismos de la enfermedad cardiovascular y el descubrimiento de biomarcadores. *Rev Esp Cardiol* 2013;66(8):657-61.
24. DeHaven CD, Evans AM, Dai H, Lawton KA. Organization of GC/MS and LC/MS metabolomics data into chemical libraries. *J Cheminform* 2010;2(1):9.
25. Pena MJ, Heinzel A, Rossing P, Parving H, Dallmann G, Rossing K, et al. Serum metabolites predict response to angiotensin II receptor blockers in patients with diabetes mellitus. *J Transl Med* 2016;14(1):203.
26. Griffin JL, Vidal-Puig A. Current challenges in metabolomics for diabetes research: a vital functional genomic tool or just a ploy for gaining funding? *Physiol Genomics* 2008;34(1):1-5.
27. Tognarelli JM, Dawood M, Shariff MI, Grover VP, Crossey MM, Cox LJ, et al. Magnetic resonance spectroscopy: principles and techniques: lessons for clinicians. *J Clin Exp Hepatol* 2015;5(4):320-8.
28. Kelly AD, Breitkopf SB, Yuan M, Goldsmith J, Spentzos D, Asara JM. Metabolomic profiling from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using targeted LC/MS/MS: application in sarcoma. *PLoS one* 2011;6(10):e25357.
29. McKillop AM, Flatt PR. Emerging applications of metabolomic and genomic profiling in diabetic clinical medicine. *Diabetes Care* 2011;34(12):2624-30.
30. Gall WE, Beebe K, Lawton KA, Adam K, Mitchell MW, Nakhle PJ, et al. α -Hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population. *PLoS One* 2010;5(5):e10883.
31. Ferrannini E, Natali A, Camastra S, Nannipieri M, Mari A, Adam KP, et al. Early metabolic markers of the development of dysglycemia and type 2 diabetes and their physiological significance. *Diabetes* 2013;62(5):1730-7.
32. Sarosiek K, Pappan KL, Gandhi AV, Saxena S, Kang CY, McMahan H, et al. Conserved metabolic changes in nondiabetic and type 2 diabetic bariatric surgery patients: global metabolomic pilot study. *Journal of diabetes research* 2016;2016.
33. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 2011;17(4):448.
34. Arneith B, Arneith R, Shams M. Metabolomics of type 1 and type 2 diabetes. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20(10):2467.
35. Guasch-Ferre M, Hruby A, Toledo E, Clish CB, Martinez-Gonzalez MA, Salas-Salvado J, et al. Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care* 2016;39(5):833-46.
36. den Ouden H, Pellis L, Rutten GEHM, Geerars-van Vonderen IK, Rubingh CM, van Ommen B, et al. Metabolomic biomarkers for personalised glucose lowering drugs treatment in type 2 diabetes. *Metabolomics* 2016;12(2):1-9.
37. Dong Y, Chen Y, Yang Y, Shou D, Li C. Urinary Metabolomic Profiling in Zucker Diabetic Fatty Rats with Type 2 Diabetes Mellitus Treated with Glimepiride, Metformin, and Their Combination. *Molecules* 2016;21(11):1446.
38. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2009. *Diabetes Care* 2009;32(Suppl 1):S13-61.
39. Liu X, Gao J, Chen J, Wang Z, Shi Q, Man H, et al. Identification of metabolic biomarkers in patients with type 2 diabetic coronary heart diseases based on metabolomic approach. *Sci Rep* 2016;6:30785.
40. Rhee EP, Clish CB, Wenger J, Roy J, Elmariah S, Pierce KA, et al. Metabolomics of Chronic Kidney Disease Progression: A Case-Control Analysis in the Chronic Renal Insufficiency Cohort Study. *Am J Nephrol* 2016;43(5):366-74.
41. Weiss RH, Kim K. Metabolomics in the study of kidney diseases. *Nat Rev Nephrol* 2012;8(1):22-33.
42. Rasmussen LG, Winning H, Savorani F, Toft H, Larsen TM, Dragsted LO, et al. Assessment of the effect of high or low protein diet on the human urine metabolome as measured by NMR. *Nutrients* 2012;4(2):112-31.
43. Paneni F, Costantino S. Diabetes and cardiovascular disease: let's push forward with translational research. *Cardiovasc Diagn Ther* 2015;5(5):407-11.
44. Chen R, Mias GI, Li-Pook-Than J, Jiang L, Lam HY, Chen R, et al. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell* 2012;148(6):1293-307.
45. Friedrich N. Metabolomics in diabetes research. *J Endocrinol* 2012;215(1):29-42.



Caso Clínico

Microdelección 8p23.1 en un paciente con trastorno generalizado del desarrollo y diagnóstico genético

Microdeletion 8p23.1 In a patient with generalized developmental disorder and genetic diagnosis

M.^a Elena Pineda Ciscar¹, Laia Segrelles Vaya² y Pilar López García¹

Servicios de ¹Análisis Clínicos y ²Pediatría. Hospital General de Ontinyent y Centro de Especialidades. Departamento de Salud Xativa-Ontinyent. Ontinyent, Valencia

Recibido: 06/11/2020
Aceptado: 04/02/2021

Correspondencia: M.^a Elena Pineda Ciscar. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital General de Ontinyent y Centro de Especialidades. Avinguda de Francisco Cerdà, 3. Laboratorio 1.^a planta. 46870 Ontinyent, Valencia
e-mail: pineda_mar@gva.es

CASO CLÍNICO

Se presenta el caso de un varón de 32 meses de edad remitido desde atención primaria a la consulta de neuropediatría de nuestro hospital por presentar un cuadro de retraso madurativo y trastorno generalizado del desarrollo. Duerme de forma inquieta y tiene dificultades en seguir las rutinas de clase. Además le cuesta centrarse y mantener la atención y no sigue las instrucciones dadas al grupo, teniendo que hablarle individualmente. En los últimos meses ha mejorado el habla lingüística y está más comunicativo pero con dificultades en la interacción social.

Respecto a sus antecedentes personales, es hijo único de padres sanos no consanguíneos sin historial clínico relevante. El embarazo fue normal con parto eutócico pretérmino (36 + 5). El test APGAR (aspecto, pulso, irritabilidad (en inglés "Grimace"), actividad, respiración), utilizado para evaluar la salud del bebé, fue de 9/10. Su peso fue de 3 kg, su talla de 47,5 cm y el perímetro cefálico de 34 cm (percentil 35). El grupo sanguíneo fue O Rh+. En su exploración física destacó una pobre comu-

nicación, una leve hipotonía y estereotipias. Además presentaba alteraciones faciales con braquicefalia, entropía, nariz bulbosa, fisuras palpebrales hacia abajo y orejas grandes. En la auscultación se observó buena ventilación bilateral sin dificultad respiratoria. El abdomen se encontraba blando y depresible y sin megalias. No se observaron estigmas neurocutáneos en la piel y la otoscopia, y exploración genitourinaria y osteoarticular estaban dentro de la normalidad.

Dados los antecedentes del paciente, se le realizan exploraciones complementarias tales como EEG y RMN y cribado del X-frágil, sin hallazgos de interés. Posteriormente, desde la consulta de neuropediatría se solicita al laboratorio un cariotipo convencional con el siguiente resultado:

Cariotipo convencional en sangre periférica: 46,XY,del(8)(p?). Norma ISCN (Internacional System for human Cytogenomics Nomenclature) 2016.

En las 20 metafases estudiadas y con la resolución alcanzada se observa un cromosoma 8 con posible pérdida de material cromosómico en el brazo corto (Fig. 1).

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00054

Pineda Ciscar ME, Segrelles Vaya L, López García P. Microdelección 8p23.1 en un paciente con trastorno generalizado del desarrollo y diagnóstico genético. Rev Med Lab 2021;2(1):41-44

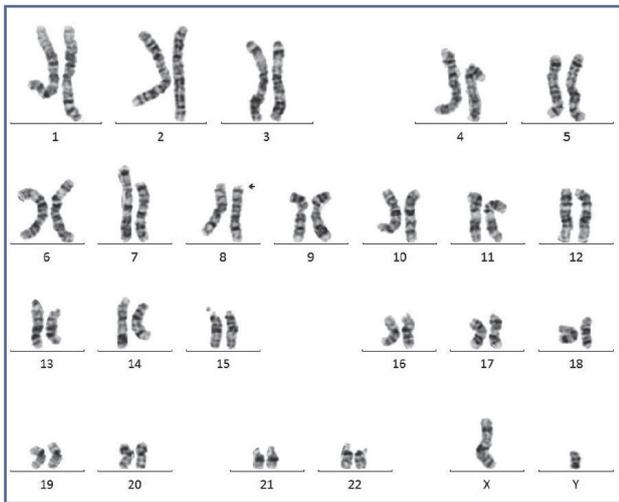


Figura 1 – Cariotipo constitucional en sangre periférica con delección intersticial en un cromosomas 8. La flecha indica el punto de ruptura en el cromosoma de la delección.

Después de este informe, el laboratorio clínico y neuropediatría consensuaron cuál podría ser la técnica más recomendable en este caso para un diagnóstico definitivo. Con el objeto de descartar que una región del brazo corto del cromosoma 8 pudiese estar trasladada en otro cromosoma y dicha traslocación fuese críptica en el cariotipo, se solicitó el estudio genético:

FISH (hibridación fluorescente *in situ*) subtelomérica 8p en sangre periférica, resultando:
ish subtel(8p,8q)x2[30] Norma ISCN 2016 (Centro Inmunológico de Alicante)

Mediante la utilización de 3 sondas: 1. TelVysion 8p G; 2. TelVysion 8q O; y 3. Control: TelVysion 17p G/O//CEP 17 Aq, se demuestra la colocalización de los telómeros 8p y 8q en el mismo cromosoma en las 30 metafases estudiadas, descartándose posible traslocación críptica no detectable por citogenética convencional.

Para confirmar o descartar la sospecha de delección intersticial en 8p tras recomendación del laboratorio y considerando la idoneidad del estudio, el neuropediatra solicitó: *aCGH* (Array Hibridación Genómica Comparada) de 750 k cuyo resultado fue: delección intersticial en heterocigosis de 3,8 Mb en citobanda 8p23.1, coordenadas genómicas: chr8:8,093065-11935.465 en la región cuya pérdida se encuentra asociada al síndrome de microdelección 8p23.1 (*sistemas genómicos*) (Fig. 2).

La alteración molecular detectada se interpreta como *patogénica* según la clasificación CNV (variación en el número de copias) y es compatible con el cuadro clínico del paciente. Se confirma pues la sospecha citogenética que permite explicar el fenotipo referido del paciente y establecer el diagnóstico de SD (síndrome de microdelección) 8p23.1.

Tras realización de cariotipos a los padres que resultaron normales, se determinó que se trataba de una delección *de novo* no requiriéndose estudios familiares adicionales.

DISCUSIÓN

Se considera microdelección genética a la pérdida de un fragmento cromosómico menor a 5 millones de pares de bases (5 Mb) de ADN. Esto puede originar síndromes en los que se pierden genes contiguos que, al tener una cantidad incorrecta de material genético, aumentan el riesgo de padecer retraso del desarrollo, dificultades de aprendizaje y anomalías congénitas.

En el caso expuesto se presenta un paciente pediátrico con SD 8p23.1 (1) que presenta una única microdelección intersticial en heterocigosis en 8p23.1. Es decir, uno de sus dos cromosomas 8 carece de un segmento del brazo corto (p) cuyo punto de ruptura está en la citobanda cromosómica 8p23.1. Se trata de un síndrome muy raro en nuestro entorno debido a delecciones de aproximadamente 3,4 Mb que afectan a la región 8p23.1 según el documento de revisión Delección 8p23 de la fundación *Unique Understanding Chromosome Disorders* (2009) (<http://rarechromo.org>), la microdelección parcial 8p23.1 está probablemente causada por la recombinación homóloga no alélica por repeticiones de bajo número de copias. Además, se desconoce la prevalencia del SD 8p23.1 siendo un desorden raro con una relación hombres/mujeres 1:1 y cuya delección generalmente aparece de forma espontánea (mutación *de novo*). Sin embargo, existen casos de padres portadores que transmiten a su descendencia el reordenamiento cromosómico de forma autosómica dominante. En cualquier caso, su diagnóstico requiere de asesoramiento genético.

Aunque existen varios casos de SD 8p23.1 descritos en la literatura, no todos son delecciones parciales intersticiales puras, sino que existen delecciones parciales junto con otra alteración molecular, duplicaciones o inversiones, o delecciones terminales (2). Dependiendo del tipo de delección encontrada, las características pueden ser diferentes. De modo que la delección intersticial de la subbanda 8p23.1 suele asociarse con anomalías fenotípicas, mientras que la delección más distal 8p23-pter presenta individuos aparentemente normales y la delección terminal 8p23.1 se relaciona con una elevada incidencia de defectos cardíacos. Con todo ello, las manifestaciones clínicas de la monosomía parcial 8p23.1 son variadas. Normalmente dependen del tamaño del segmento ausente de los genes implicados y las más comunes son: trastorno del desarrollo, alteraciones del comportamiento como falta de concentración e hiperactividad, déficit intelectual leve (a veces inteligencia normal), anomalías craneofaciales, déficit de crecimiento postnatal, criptorquidia e hipospadia en varones y posibles anormalidades cardíacas. Por lo tanto, es importante conocer las posibles implicaciones clínicas del SD 8p23.1 y su actual diagnóstico genético.

La caracterización detallada tanto del fenotipo como del genotipo del SD 8p23.1 puede aportar datos muy relevantes en el diagnóstico y pronóstico de estos pacientes. Asimismo, identificar el tipo y extensión de la microdelección permite realizar un adecuado consejo genético y diagnosticar/prever posibles patologías o

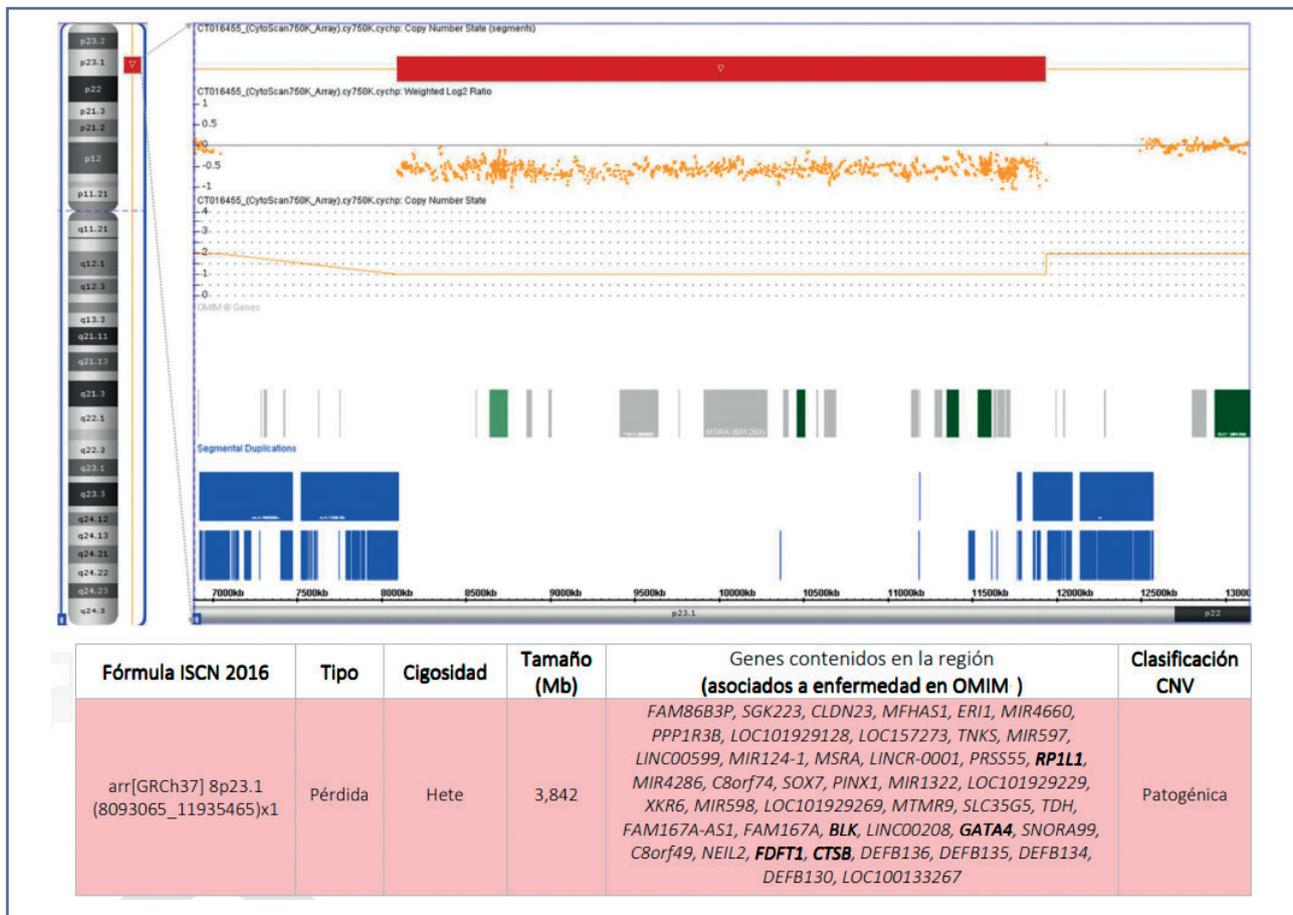


Figura 2 – Array-CGH en sangre periférica con alteración genética detectada en el cromosoma 8 (protocolo de Applied Biosystems® para Array CytoScan® 750K). Resultados del array-CGH: se observa dentro del recuadro la relación de CNV encontradas en la muestra, los genes contenidos en la región estudiada y en negrita los genes asociados a enfermedad en OMIM*.

Definiciones: Pérdida: disminución del n.º de copias de la región indicada respecto a la referencia utilizada. CNV (variación en el número de copias): segmento de ADN igual o mayor de 1 kb cuyo número de copias es variable comparándolo con un genoma de referencia. Clasificación CNV: variante patogénica: CNV previamente descrita en la literatura como patogénica, asociada a un fenotipo clínico definido, o CNV visibles a nivel citogenético. ISCN: Internacional System for human Cytogenomics Nomenclature. *OMIM (Online Mendelian Inheritance in Men): <https://omim.org/>

complicaciones asociadas. Así, en los casos más patológicos de este síndrome, es posible una anomalía cardíaca congénita o hernia diafragmática (3) si existe haploinsuficiencia en el gen del corazón *GATA-4* proximal o *SOX7*, situados en 8p23.1. Además, en algunos casos el SD 8p23.1 puede confundirse clínicamente con otros como el SD 22q11.2 (4). Ambos pueden tener trastornos del comportamiento, pero mientras que el SD 8p23.1 puede ser más leve y con desarrollo intelectual normal, el SD 22q11.2 se relaciona más con alteraciones psiquiátricas, siendo más grave. Por ello es importante un diagnóstico temprano y diferencial que conlleve el establecimiento de una rehabilitación precoz y un tratamiento adecuado, según las características clínicas de cada entidad.

Es importante resaltar la importancia de la aportación del analista en el conocimiento y recomendación de las técnicas genéticas más oportunas para cada caso. La colaboración entre el laboratorio y servicio de pediatría a la hora de establecer cuál sería el estudio genético y las pruebas analíticas más adecuadas a realizar, fue de gran ayuda para la resolución diagnóstica del caso. Esto contribuyó a la instauración precoz del tratamiento y control de esta enfermedad. En el caso del SD 8p23.1 es necesario el seguimiento clínico periódico por pediatría, cardiología y terapeutas que mejoren el desarrollo y aprendizaje personal.

La estrategia diagnóstica genética ante un paciente con sospecha de discapacidad intelectual debería iniciarse con la solicitud de un cariotipo convencional y cribado del X-frágil (principal causa genética de discapacidad intelectual en niños) (5). En el caso de una deleción terminal grande será fácilmente detectable por análisis cromosómico de rutina, pero para la detección de microdeleciones intersticiales, es recomendable solicitar análisis citogenéticos más precisos como MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples), FISH (6) y aCGH (7).

En el caso presentado se destaca la aplicación de los dos últimos, ya que:

- La FISH, mediante el marcaje e hibridación de los cromosomas con sondas específicas que emiten fluorescencia, permite la visualización, distinción y estudio de los cromosomas y anomalías que puedan presentar (puede determinar aneuploidías, microdeleciones, duplicaciones e inversiones).
- El aCGH es muy empleado para la detección de ganancias y pérdidas de material genético, como microdeleciones y duplicaciones en el ADN (analizando las variaciones en el número de copias (CNV) en relación con el nivel de ploidía del ADN de una muestra, en comparación con una muestra de referencia sin la necesidad de realizar un cultivo celular). Estas CNV a menudo son causa de discapacidad intelectual, trastorno del espectro autista y/o múltiples malformaciones congénitas.

La utilización cada vez más asequible y eficiente de técnicas citogenéticas moleculares ha permitido definir mejor los síndromes de microdelección y poder diferenciarlos de otras patologías, contribuyendo a establecer el pronóstico e instaurar el tratamiento más apropiado para cada paciente. Además, el análisis molecular de las microdeleciones así como el hallazgo de los genes responsables de fenotipos de haploinsuficiencias, ayudan en el conocimiento de las bases embriológicas y genéticas de estos síndromes, así como en la búsqueda de enfermedades relacionadas con ellos.

PUNTOS A RECORDAR:

- Las manifestaciones clínicas de los SD pueden ser muy variables dependiendo de la extensión de la deleción afectada, lo que puede dificultar su diagnóstico. De modo que ante casos de retraso mental leve en niños, la estrategia diagnóstica debería comenzar por la solicitud de cariotipo convencional y estudio del cromosoma X-frágil.
- Con el análisis cromosómico junto a técnicas de citogenética molecular como FISH, MLPA, y en especial el aCGH, se pueden detectar microdeleciones cromosómicas y propiciar el diagnóstico diferencial con otros desórdenes genéticos.
- La aparición de técnicas de diagnóstico genético molecular cada vez más asequibles ha favorecido la detección genética de casos como el SD 8p23.1 que anteriormente podrían estar infradiagnosticados y actualmente podrían aumentar su incidencia.
- Para una apropiada elección en la solicitud de análisis citogenéticos moleculares es imprescindible una fluida comunicación entre el facultativo solicitante, en este caso el pediatra, y el facultativo del laboratorio, que debería tener un conocimiento actualizado de las pruebas genéticas adecuadas para cada caso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ballarati L, Cereda A, Caselli R, Selicorni A, Recalcati MP, Maitz S, et al. Genotype-phenotype correlations in a new case of 8p23.1 deletion and review of the literature. *Eur J Med Genet* 2011;54(1):55-9. DOI: 10.1016/j.ejmg.2010.10.003
2. Reddy KS. A paternally inherited terminal deletion, del(8)(p23.1) pat, detected prenatally in an amniotic fluid sample: a review of deletion 8p23.1 cases. *Prenat Diagn* 1999;19(9):868-72. DOI: 10.1002/(sici)1097-0223(199909)19:9<868::aid-pd641>3.0.co;2-a
3. Wat MJ, Shchelochkov OA, Holder AM, Breman AM, Dagli A, Bacino C, et al. Chromosome 8p23.1 deletions as a cause of complex congenital heart defects and diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet A* 2009;149A(8):1661-77. DOI: 10.1002/ajmg.a.32896
4. Molck M, Monteiro F, Simioni M, Gil-da-Silva-Lopes V. 8p23.1 Interstitial Deletion in a Patient with Congenital Cardiopathy, Neurobehavioral Disorders, and Minor Signs Suggesting 22q11.2 Deletion Syndrome. *J Dev Behav Pediatr* 2015;36(7):544-8. DOI: 10.1097/DBP.0000000000000197
5. Guitart-Feliubadaló M, Brunet-Vega A, Villatoro Gómez S, Baena Díez N, Gabau Vila E. Causas cromosómicas que originan el retraso mental. *Rev Neurol* 2006;42(Suppl 1):S21-6.
6. Baialardo, Edgardo M. El estudio cromosómico y la técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) en el diagnóstico de síndromes de microdelección. *Medicina Infantil* 2012;19;(2):137-43.
7. Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet* 2004;66:488-95.

Imagen/Infografía**Cristales de amoxicilina en orina***Amoxicillin crystals in urine**Rocío Cabra-Rodríguez¹, Esperanza Lepe-Balsalobre², Ana Cía-González¹*¹UGC de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez. Huelva. ²UGC de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Nuestra Señora de Valme. Sevilla**Recibido:** 11/02/2021
Aceptado: 22/02/2021**Correspondencia:** Esperanza Lepe-Balsalobre. UGC de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Nuestra Señora de Valme. Ctra. de Cádiz Km. 548,9. 41014 Sevilla
e-mail: esplepbal@gmail.com

Se expone un caso de un paciente de 58 años de edad, sin antecedentes personales de interés, en tratamiento con amoxicilina durante 4 días por bronquitis aguda. Acude al servicio urgencias por presentar persistencia del cuadro febril de 6 días de evolución a pesar de tratamiento antibiótico. Se solicitan estudios analíticos entre los que se encuentra el uroanálisis. La visualización microscópica del sedimento urinario revela la presencia de múltiples cristales en forma de agujas, delgados e incoloros con distribución aleatoria y con elevada birrefringencia (Fig. 1). Esta apariencia está descrita en la literatura como "gavillas de trigo" y es sugestiva de cristaluria de origen medicamentoso por amoxicilina; posteriormente se confirma su origen por cromatografía líquida de intercambio catiónico (1,2).

En concreto, la amoxicilina es un antibiótico beta-lactámico que se excreta principalmente por vía renal (90 % por túbulo proximal y 10 % por filtrado glomerular), lo que implica que factores como dosis altas, diuresis disminuidas o acidez urinaria puedan provocar una reducción en la solubilidad de este tipo de fármacos en la orina (3).

La cristaluria de etiología medicamentosa no es un hallazgo frecuente en el estudio del sedimento urinario y puede llegar a originar fracaso renal agudo debido al daño tubular provocado por la precipitación de estos cristales. Este caso ilustra la importancia de la identificación del origen de la cristaluria permitiendo una modificación de la posología o del tratamiento antibiótico empleado y evitando posibles complicaciones derivadas de ello (4).

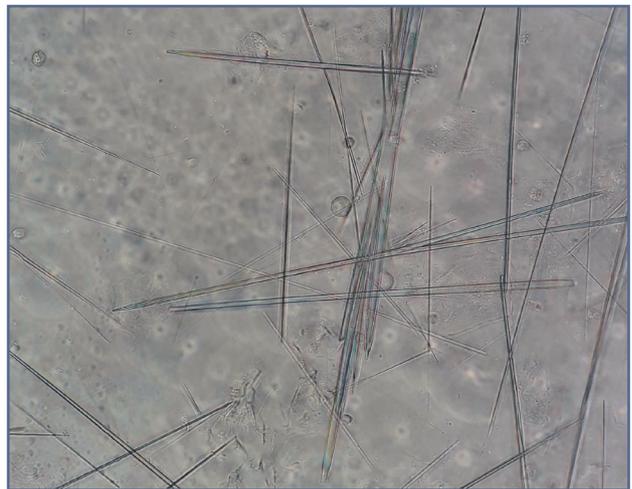


Figura 1 – Estudio de sedimento urinario con microscopio óptico. Obsérvense múltiples cristales en forma de aguja de origen medicamentoso por administración oral de amoxicilina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Henschkowski J, Vogt B. Crystalluria. Ther Umsch 2006;63:591-4.
2. Couto J, Pontes Dos Santos L, Alves JC, López R, Maldonado C. Amoxicillin Crystalluria: A Rare Side-Effect of a Commonly Prescribed Antibiotic. Eur J Case Rep Intern Med 2017;4(10):000736.
3. Fogazzi GB, Cantù M, Saglimbini L, Daudon MA. A rare but possible cause of crystalluria. Nephrol Dial Transplant 2003;18:212-4.
4. Boffa JJ, De Preneuf H, Bouadma L, Daudon M, Pallot JL. Acute renal failure after amoxicillin crystallization. Presse Med 2000;29:699-701.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00071

Cabra-Rodríguez R, Lepe-Balsalobre E, Cía-González A. Cristales de amoxicilina en orina. Rev Med Lab 2021;2(1):45

