



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**  
**TESINA DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**  
**LICENCIADA EN CIENCIAS DE LA SALUD**  
**EN LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO.**

**TEMA:**

**“UTILIZACIÓN DEL MÉTODO ELISA EN LA DETERMINACIÓN DEL PÉPTIDO C EN PACIENTES DIABÉTICOS ATENDIDOS EN EL HOSPITAL JOSÉ MARÍA VELASCO IBARRA DE LA CIUDAD DEL TENA, EN EL PERÍODO FEBRERO-JULIO 2015”**

**AUTORES**

**PATRICIA MARILIN VELÁSQUEZ VALLES**

**TUTOR**

**Lic. MERCEDES BALLADARES**

**RIOBAMBA- ECUADOR**  
**JULIO 2015**

## HOJA DE APROBACIÓN

El tribunal de defensa privada conformada por el Msc. Celio García presidente del tribunal; Lcda. Mercedes Balladares miembro del tribunal y la Dra. Patricia Miño miembro del tribunal, certificamos que la señorita Patricia Marilyn Velásquez Valles portadora de la cédula N° 171871427-0 egresada de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Universidad Nacional de Chimborazo, se encuentra apta para el ejercicio académico de la defensa pública de la tesina previa a la obtención del título de licenciados en Ciencias de la Salud en Laboratorio clínico e Histopatológico con el tema de investigación: **“UTILIZACIÓN DEL MÉTODO ELISA EN LA DETERMINACIÓN DEL PÉPTIDO C EN PACIENTES DIABÉTICOS ATENDIDOS EN EL HOSPITAL JOSÉ MARÍA VELASCO IBARRA DE LA CIUDAD DEL TENA, EN EL PERÍODO FEBRERO-JULIO 2015”**.

Una vez que ha sido realizado las revisiones periódicas y ediciones correspondientes a la tesina.



Msc. Celio García  
Presidente del tribunal.



Dra. Patricia Miño  
Miembro del tribunal.



Lcda. Mercedes Balladares  
Miembro del tribunal.

## ACEPTACIÓN DE LA TUTORA

Por medio de la presente, hago constar que he leído el protocolo del Proyecto de Tesina de Grado presentado por la señorita **Patricia Marilin Velásquez Valles** portadora de la cédula N° 171871427-0 para optar al título de **Licenciada en Laboratorio Clínico e Histopatológico** y que acepto asesorar al estudiante en calidad de tutora, durante la etapa del desarrollo del trabajo hasta su presentación y evaluación.

Riobamba, 12 de Febrero del 2015.

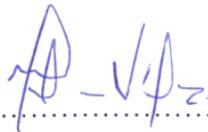


.....  
**Lic. Mercedes Balladares**

**Docente - Tutor**

## **DERECHO DE AUTORÍA**

Yo, **Patricia Marilin Velásquez Valles** portadora de la cédula de identidad N° 171871427-0, declaro que soy responsable de las ideas, resultados y propuestas planteadas en este trabajo investigativo y que el patrimonio intelectual del mismo, pertenece a la Universidad Nacional de Chimborazo.



.....

**PATRICIA MARILIN VELÁSQUEZ VALLES**

**CC. 171871427-0**

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo principalmente a Dios por haberme dado fuerza, salud y vida; a mis padres por inculcar en mi la importancia de estudiar, sin su comprensión, paciencia, amor y apoyo no hubiera sido posible la culminación de esta carrera, porque todo lo que soy se lo debo a ellos.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi familia por ser mi fuerza impulsadora y por estar presente en todo momento.

“LA GRATITUD ES LA MEMORIA DEL CORAZÓN”  
Proverbio francés.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación pretende realizar la determinación del péptido C utilizando el método de Elisa, en pacientes diabéticos atendidos en el hospital José María Velasco Ibarra, en el período febrero-julio 2015. Además la siguiente investigación tiene como finalidad conocer la formación de los niveles de péptido C a partir de las células beta del páncreas. Y la determinar los valores exactos de Péptido C en las muestras de sangre utilizando el método cuantitativo de Elisa ya que en la actualidad se puede observar un gran número de pacientes con diabetes. La investigación fue del tipo descriptiva – correlacionada, incluyendo pacientes con posible diagnóstico de Diabetes mellitus. Se identificó una población de 50 individuos con diagnóstico de Diabetes mellitus, de los cuales el 48% correspondían al género femenino y el 52% restante, al género masculino, en diversos grupos etarios, a los cuales se les realizaron las pruebas de laboratorio en función de los valores de referencia según la técnica de ensayo inmunoenzimométrico, en el total de la población, utilizando el valor (0,7 - 1,9 ng/ml). Se utilizó la técnica de ensayo inmunoenzimométrico, para la determinación de los niveles de Péptido C, los que constan en la investigación de campo, sistematizados en cuadros y gráficos, e interpretados de acuerdo con la fundamentación teórica y los datos empíricos, facilitaron la discusión en función al cumplimiento de los objetivos y la comprobación de las hipótesis.



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**CENTRO DE IDIOMAS**

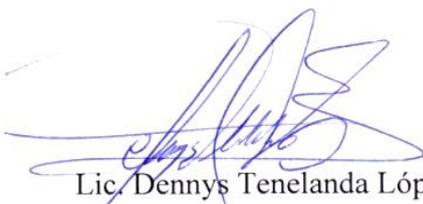
---

## ABSTRACT

This research aims to determine C-peptide using the Elisa method among diabetic patients treated at José María Velasco Ibarra Hospital, in the period February to July 2015. In addition the following research is conducted to know the level formation of C-peptide from pancreatic beta cells and determine the exact values of C-peptide in the blood samples using the quantitative Elisa method due to nowadays there are many patients with diabetes. The research was descriptive - correlated, including patients with possible diagnosis of diabetes mellitus. A population of 100 individuals diagnosed with Diabetes mellitus was identified, 48% were female gender, and 52% were males in various age groups, these patients were put under laboratory tests according to reference values based on the immunoenzymometric essay technique to determine the C-peptide levels in total population, using the value (0.7 to 1.9 ng / ml). Immunoenzymometric essay technique was used to determine the levels of C-peptide, which are present on field research, systematized in charts and graphs, and interpreted considering the theoretical framework and empirical data, they facilitated discussion about the objectives and proving hypotheses.

Riobamba, July 1, 2015

### TRANSLATION REVIEWED BY:



Lic. Dennys Tenelanda López.  
**ENGLISH TEACHER-UNACH**



## ÍNDICE GENERAL

TEMA: .....	I
HOJA DE APROBACIÓN .....	II
ACEPTACIÓN DE LA TUTORA .....	III
DERECHO DE AUTORÍA.....	IV
DEDICATORIA .....	V
AGRADECIMIENTO .....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT .....	VIII
ÍNDICE GENERAL .....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE TABLAS .....	XIII
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	XIV
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I	
1. PROBLEMATIZACIÓN.....	3
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. ....	3
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.3. OBJETIVOS.....	4
1.3.1. Objetivo General.....	4
1.3.2. Objetivos Específicos.....	4
1.4. JUSTIFICACIÓN .....	4
CAPÍTULO II	
2. MARCO TEÓRICO .....	6
2.1. POSICIONAMIENTO PERSONAL .....	6
2.2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA .....	6
2.2.1. El Páncreas .....	6
2.2.2. Descripción (Configuración externa).....	7
2.2.2.1. Cabeza.....	7
2.2.2.2. Cuello.....	7

2.2.2.3.	Cuerpo.....	8
2.2.2.4.	Cola.....	8
2.2.3.	Constitución anatómica (Conductos excretores).....	8
2.2.3.1.	Páncreas endócrino.....	8
2.2.3.2.	Conducto pancreático de wirsung.....	9
2.2.3.3.	Conducto pancreático de santorini.....	9
2.2.4.	Histología del páncreas.....	10
2.2.4.1.	Células alfa.....	10
2.2.4.2.	Células beta.....	11
2.2.4.3.	Células delta.....	11
2.2.4.4.	Células F.....	12
2.2.5.	Hidratos de carbono.....	13
2.2.6.	Ciclo de krebs.....	14
2.2.6.1.	Reacciones del ciclo de krebs.....	15
2.2.6.2.	Etapas del ciclo de krebs.....	16
2.2.7.	Péptido C.....	20
2.2.7.1.	Interpretación de los resultados del test de péptido- C.....	22
2.2.8.	La insulina.....	22
2.2.8.1.	Síntesis.....	24
2.2.8.2.	Liberación de la insulina.....	25
2.2.9.	La Glucogénesis.....	27
2.2.9.1.	Proceso de la glucogénesis.....	29
2.2.10.	Gluconeogénesis.....	29
2.2.11.	Glucólisis.....	30
2.2.12.	Diabetes.....	31
2.2.12.1.	Factores de riesgo no modificables.....	32
2.2.12.2.	Factores de riesgo modificables.....	32
2.2.12.3.	Clasificación.....	33
2.2.12.4.	Diabetes Mellitus Tipo I.....	33
2.2.12.4.1.	Síntomas y signos.....	35
2.2.12.4.2.	Tratamiento.....	35
2.2.12.5.	Diabetes Mellitus Tipo II.....	36
2.2.12.5.1.	Síntomas y signos.....	37
2.2.12.5.2.	Reducción de riesgo de desarrollo diabetes mellitus tipo II.....	38

2.2.12.5.3. Tratamiento .....	38
2.2.12.6. Diabetes gestacional .....	39
2.2.12.6.1. Quienes tienen riesgo de padecer diabetes gestacional.....	39
2.2.12.6.2. Consecuencias de padecer diabetes gestacional .....	39
2.2.12.6.3. Problemas después del parto con la diabetes gestacional .....	40
2.2.12.7. Consecuencias de la diabetes .....	40
2.2.13. Inmunoensayos .....	41
2.2.13.1. Antígeno.....	41
2.2.13.2. Anticuerpo.....	41
2.2.13.3. Reacción Antígeno- Anticuerpo (Ag-Ac).....	41
2.2.13.4. Anticuerpo monoclonal.....	43
2.2.13.4.1. Anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados.....	43
2.2.13.4.2. Anticuerpos policlonales.....	44
2.2.14. Tipos de inmunoensayos.....	45
2.2.14.1. Enzimoimmunoanálisis (EIA).....	45
2.2.14.2. Enzimoimmunoanálisis indirecto .....	45
2.2.14.3. Técnica de elisa .....	46
2.2.14.3.1. Elisa directo.....	48
2.2.14.3.2. Elisa indirecto.....	49
2.2.14.3.3. Elisa sándwich.....	50
2.2.14.3.4. Elisa competitivo .....	51
2.2.14.3.5. Fases de un ensayo elisa.....	52
2.2.15. Radioinmunoensayo (RIA) .....	53
2.2.16. Fluoroinmunoanálisis (FIA).....	54
2.2.17. Electroquimioluminiscencia (ECLIA) .....	55
2.2.18. Técnica en la determinación del péptido C – ACCU BIND .....	55
2.2.18.1. Principio- ensayo inmunoenzimométrico (TIPO 3) .....	56
2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS .....	66
2.4. HIPÓTESIS.....	68
2.5. VARIABLES.....	68
2.5.1. Variable independiente .....	68
2.5.2. Variable dependiente .....	68
2.5.3. Operalización de variables .....	69

CAPÍTULO III	
3.	MARCO METODOLÓGICO .....70
3.1.	MÉTODOS.....70
3.2.	TIPO DE ESTUDIO .....70
3.3.	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....70
3.4.	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....71
3.5.	POBLACIÓN Y MUESTRA .....71
3.5.1.	Población.....71
3.5.2.	Muestra.....71
3.6.	TÉCNICA EN INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS .....71
3.7.	TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS .....72
CAPÍTULO IV .....73	
4.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS .....73
4.1.	COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....78
CAPÍTULO V.....79	
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....79
5.1.	CONCLUSIONES .....79
5.2.	RECOMENDACIONES.....79
BIBLIOGRAFÍA .....80	
ANEXOS .....82	

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 2. 1	CÉCULA BETA.....	11
FIGURA N° 2. 2	GENERALIDADES DEL PÁNCREAS.....	13
FIGURA N° 2. 3	REACCIÓN DEL CICLO DE KREBS .....	15
FIGURA N° 2. 4	DIABETES TIPO I.....	35
FIGURA N° 2. 5	DIABETES TIPO II.....	37
FIGURA N° 2. 9	REACCIÓN ANTÍGENO- ANTICUERPO.....	43
FIGURA N° 2. 6	TÉCNICA ELISA.....	48
FIGURA N° 2. 7	ELISA TIPO SANDWICH .....	50
FIGURA N° 2. 8	ELISA COMPETITIVO .....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 2. 1	RESULTADOS DE LA MUESTRA CONTROL .....	61
TABLA N° 2. 2	PRECISIÓN INTRA- ENSAYOS (ng/ml).....	62
TABLA N° 2. 3	PRECISIÓN INTER- ENSAYO (ng/ml) .....	63
TABLA N° 2. 4	EXACTITUD.....	63
TABLA N° 2. 5	ESPECIFICIDAD .....	64
TABLA N° 4. 1	PACIENTES QUE SE EXAMINARÓN PARA DETERMINACIÓN DE PÉPTIDO C.....	73
TABLA N° 4. 2	POBLACIÓN SEGÚN GRUPO ETARIO.....	76
TABLA N° 4. 3	VALORES DE PÉPTIDO C EN LA POBLACIÓN .....	77
TABLA N° 4. 4	PACIENTES SEGÚN EL GÉNERO .....	75
TABLA N° 4. 5	VALORES DE PÉPTIDO C EN LA POBLACIÓN .....	78

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 4. 2	POBLACIÓN SEGÚN EL GÉNERO.....	75
GRÁFICO N° 4. 3	POBLACIÓN SEGÚN GRUPO ETARIO.....	76
GRÁFICO N° 4. 4	VALORES DE PÉPTIDO C EN LA POBLACIÓN .....	77

## INTRODUCCIÓN

La presente investigación se realizó con el fin de determinar la concentración de péptido C en pacientes diabéticos esencial para la correcta dosificación de insulina, para establecer entre la insulina producida por el cuerpo y la insulina parenteral administrada al paciente; el estudio se realizó en el Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad del Tena. La investigación partió de la hipótesis de conocer la concentración de péptido C mediante el ensayo de Elisa en pacientes diabéticos, que les permitirá mejorar la calidad de vida a las personas que padecen de esta patología.

El tipo de muestra empleada para la investigación fue de suero obtenido por punción venosa en tubos sin aditivos, la población estudiada fue en un total de 50 personas por existir poca población.

Las fuentes bibliográficas provienen de investigaciones realizadas en el Laboratorio Clínico del Hospital José María Velasco Ibarra y en libros obtenidos en la biblioteca de la Universidad Nacional de Chimborazo

En el trabajo presenta los siguientes capítulos:

En el capítulo I se encuentra el planteamiento del problema donde señala que esta patología es una problemática de nivel mundial que no respeta edad, sexo o condición social que va en aumento precipitadamente, encontramos también la justificación, objetivo general y objetivos específicos de la investigación.

El capítulo II consta con revisión bibliográfica actualizada de la cual se pudo extraer sobre los tipos de diabetes, anatomía fisiología del páncreas, tipos de inmunoensayos, definición de insulina, glucólisis, gluconeogénesis, ciclo de Krebs, péptido C, técnica para la determinación de péptido C todo esto de gran importancia para seguir con la investigación.

En el capítulo III se encuentra todo referente a tipos de investigación, tipos de estudios empleados, desarrollo de tablas estadísticas referentes a los datos que se utilizaron en la investigación, así como la población, el tipo de muestra, las técnicas e instrumentos que se utilizaron para la recolección de datos y el reporte de resultados.

En el capítulo IV se halla la interpretación de los resultados obtenidos en la investigación, representados en tablas y gráficos estadísticos.

En el capítulo V consta de las conclusiones recomendaciones de la investigación respaldo bibliográfico y como anexos fotos, como evidencia del proceso de la investigación.

## CAPÍTULO I

### 1. PROBLEMATIZACIÓN.

#### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La diabetes es una patología que en la actualidad se ha convertido en un problema que afecta no solamente a personas adultas sino también a jóvenes incluso a niños, a nivel mundial la incidencia de esta patología es de 366 millones, a nivel de Latinoamérica es de 15.3 millones, en el país hay 414.514 de personas afectadas con este mal, el 80% de las personas con diabetes viven en países de ingresos medios y bajos. Más de 21 millones de niños nacidos vivos fueron afectados por la diabetes durante la gestación en 2013. Todos los tipos de diabetes aumentan, en particular la diabetes tipo 2; el número de personas con diabetes casi se duplicará para el año 2035.

La insulina es una hormona que controla el nivel de azúcar en la sangre, todos los pacientes con diabetes tipo 1 y algunas personas con diabetes tipo 2, necesitan recibir insulina para poder controlar su nivel de azúcar en sangre. Las complicaciones de origen diabético son causa principal de discapacidad, de disminución de calidad de vida y de muerte. Las complicaciones diabéticas pueden afectar a distintas partes del organismo y se manifiestan de manera diferente en cada persona. Las personas diabéticas pueden desarrollar una serie de problemas en los pies como consecuencia de los daños en los nervios y vasos sanguíneos, estos problemas pueden conducir fácilmente a la infección y ulceración, lo que aumenta el riesgo de amputación.

Por consiguiente, de acuerdo a lo antes mencionado este trabajo de investigación pretende determinar los niveles del péptido C utilizando el método de Elisa en pacientes diabéticos atendidos en el Hospital José María Velasco Ibarra en la ciudad de Tena, periodo febrero-Julio 2015.

#### 1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Por qué debemos determinar los niveles de péptido C en sangre de los pacientes diabéticos que son atendidos en el Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad del Tena, utilizando el método de Elisa?

### 1.3. OBJETIVOS

#### 1.3.1. Objetivo General

Utilizar el método de Elisa para la determinación de los niveles de péptido C en pacientes diabéticos que son atendidos en el Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad del Tena.

#### 1.3.2. Objetivos Específicos

- Analizar contenidos científicos sobre la diabetes consecuencias clínicas, exámenes de laboratorio que ayudan al control y tratamiento del paciente.
- Dosificar el nivel de Péptido C en las muestras de sangre utilizando el método cuantitativo de Elisa bajo parámetros de calidad.
- Validar los resultados obtenidos que servirán de ayuda para el tratamiento médico de los pacientes diabéticos.

### 1.4. JUSTIFICACIÓN

La insulina es indispensable para que las células absorban el azúcar o glucosa que necesitan; sin embargo, enfermedades y problemas genéticos pueden hacer que los niveles de esta sustancia se incrementen y, en consecuencia, desencadenen trastornos diversos. Además de estos problemas ocasionados por la hiperinsulinemia, la generación aumentada de insulina puede causar un insulinomas o un tumor en el páncreas, mismo que no suele ser maligno (sólo del cinco al 10 % de los casos son tejidos de tipo canceroso) y que puede presentarse aislado o diseminado en pequeños conglomerados.

Otra causa de alteración en el equilibrio entre insulina y glucosa es el hiperinsulinismo congénito, un padecimiento que se presenta en niños y que puede ocasionar estado de aturdimiento, confusión, falta de atención y conducta irracional (neuroglucopenia), ya que el sistema nervioso no cuenta con los nutrientes necesarios para funcionar adecuadamente.

También puede ser motivo de daños neuronales y retraso en el desarrollo de habilidades, pues el cerebro todavía se encuentra en etapa de maduración. Finalmente, debemos mencionar una condición más que puede generar hiperinsulinemia y es, la insuficiencia

renal; es decir, aquellos casos en que los riñones son incapaces de filtrar la sangre adecuadamente. Cuando este problema es muy avanzado, el exceso de insulina no se elimina por la orina y, en consecuencia, baja la concentración de azúcar.

De acuerdo a la problemática suscitada en nuestro medio, el presente trabajo de investigación pretende determinar los valores de péptido C utilizando el método de Elisa, ya que es de vital importancia en la ayuda diagnóstica de diferentes patologías que acosan al ser humano en este caso en la diabetes.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. POSICIONAMIENTO PERSONAL

Muchos de los pacientes con diabetes mellitus no insulino dependientes no diagnosticada son asintomáticos. Es muy frecuente que estos pacientes sean detectados por exámenes de rutina de laboratorio de sangre u orina. Estas personas presentan frecuentemente sobrepeso y tienen antecedentes familiares de esta patología.

La insulina es secretada por el páncreas. Esta hormona es indispensable para el buen funcionamiento del organismo: permite que el azúcar (glucosa) de la sangre penetre en el interior de las células, que lo utilizan para producir energía. Cuando la producción de insulina no existe o es casi nula, el azúcar en la sangre aumenta de forma anómala (hiperglucemia). Se habla, entonces, de diabetes insulino dependiente o, más exactamente, de diabetes mellitus insulino dependiente.

A criterio de la autora, es fundamental conocer los niveles de péptido C en sangre para la determinación del nivel de insulina en pacientes diabéticos que son atendidos en el Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad del Tena, en el período Febrero-Julio 2015, y poder determinar un correcto diagnóstico y un adecuado tratamiento en el paciente con diabetes mellitus tipo 1 y 2.

#### 2.2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

##### 2.2.1. El Páncreas

El páncreas, presente en todos los seres humanos y otros vertebrados, está ubicado en la parte superior del abdomen, detrás del estómago y delante de la columna vertebral. Es una glándula del tamaño de una mano, que tiene 18 centímetros de largo, 4 de alto, 2 de ancho y que pesa 65 gr. Está conectada al intestino delgado por un tubo, que es el encargado de que algunas enzimas del páncreas lleguen al duodeno y lleven a cabo su función de digestión (MAYORAL LUIS G, M.D., M.S, 1998).

Al páncreas se le conoce como una glándula por su capacidad de producir y secretar sustancias que actúan dentro del cuerpo. Es importante saber que las glándulas pueden ser endocrinas, si las sustancias que se secretan, hormonales, son secretadas directamente en el torrente sanguíneo, o exocrinas, si las sustancias, generalmente enzimas, se secretan a cavidades como la boca o el intestino (MAYORAL LUIS G, M.D., M.S, 1998).

#### 2.2.2. Descripción (Configuración externa)

El páncreas es una glándula de forma alargada de derecha a izquierda y algo menos de abajo hacia arriba, pero aplastada en sentido anteroposterior. Describe una concavidad posterior, moldeada sobre la columna lumbar a nivel de L1 – L2. Se describe en él una cabeza, un cuello, un cuerpo y una cola. (LATARJET Y RUIZ, 2005).

##### 2.2.2.1. Cabeza.

La cabeza es la parte orientada algo hacia adelante y a la derecha, enmarcada por el duodeno. Su borde superior y su borde derecho están excavados por un canal, en el cual se aplica el duodeno “como un neumático en su llanta” (Gregoire). El canal desaparece en el borde inferior de la cabeza que está en contacto con la porción horizontal del duodeno. (LATARJET Y RUIZ, 2005).

Abajo y hacia la izquierda, la cabeza se curva en forma de gancho: es el proceso unciforme (páncreas menor de Winslow), que pasa más o menos profundamente por detrás de los vasos mesentéricos superiores, siguiendo al duodeno. La cara anterior del proceso uniforme está excavada en forma de canal por el pasaje de la vena mesentérica superior. (LATARJET Y RUIZ, 2005).

##### 2.2.2.2. Cuello.

El cuello o istmo de páncreas une la cabeza al cuerpo. Es una porción algo estrecha, de aproximadamente dos centímetros de longitud. El cuello del páncreas está limitado.

Arriba, por la porción superior del duodeno. En este borde superior, el cuello pancreático presenta dos tubérculos: un tubérculo anterior, ubicado por debajo del duodeno y que se confunde con la parte superior de la cabeza del páncreas, y un tubérculo posterior, el tubérculo omental (epiploico), situado por detrás del duodeno, en la unión del cuello con el cuerpo del páncreas.

Abajo, por la incisura pancreática, donde encontramos el pasaje de los vasos mesentéricos superiores.

#### 2.2.2.3. Cuerpo

El Cuerpo corresponde a la primera y segunda lumbares. Su cara posterior está en relación, de derecha a izquierda con la aorta, la vena mesentérica inferior, la cápsula suprarrenal y el riñón izquierdo. La cara anterior es cruzada oblicuamente por el ángulo duodenoyeyunal y corresponde en todos sus puntos a la cara posterior del estómago, la cual determina en ella una verdadera marca o impresión, la impresión gástrica. El borde superior se pone en contacto con el tronco celiaco en la línea media, y lateralmente con el pilar izquierdo del diafragma, el riñón y la cápsula suprarrenal izquierdos. Va acompañado de la vena esplénica, que a este nivel se labra un semiconducto, y la arteria esplénica, más elevada y más flexuosa. El borde inferior, más grueso que el precedente, corresponde a la inserción del mesocolon transversal. (<http://www.anatomia.tripod.com/pancreas.htm>)

#### 2.2.2.4. Cola

La cola afilada y redondeada según los individuos, entra en contacto con el hileo del bazo o está unida al mismo por un repliegue peritoneal, en cuyo espesor se alojan los vasos esplénicos. (<http://www.anatomia.tripod.com/pancreas.htm>)

#### 2.2.3. Constitución anatómica (Conductos excretores)

Está constituido por lobulillos que se agrupan entre sí, desembocando en pequeños conductos lobulillos primitivos y ácinos. Estos elementos están separados por tejido conjuntivo, en cuyo interior se encuentran repartidos unos corpúsculos especiales, los islotes de Langerhans o puntos foliculares de RENAULT. (<http://www.anatomia.tripod.com/pancreas.htm>)

- Glándula
- Conducto pancreático de Wirsung
- Conducto pancreático accesorio de Santorini

#### 2.2.3.1. Páncreas endócrino

Está formada por dos tejidos diferentes:

La glándula de secreción externa con ácinos glandulares, comparables a los de las glándulas salivares.

Cada ácino posee un conducto excretor para el jugo pancreático.

Las glándulas de secreción interna está constituida por los islotes pancreáticos (de Langerhans), situados entre los acinos. Los islotes están rodeados por una rica red vascular, que es la vía de eliminación de las hormonas producidas por las distintas células que los constituyen.

#### 2.2.3.2. Conducto pancreático de wirsung

Se origina a nivel de la cola del páncreas y sigue el eje mayor del cuerpo de la glándula en dirección hacia la cabeza del páncreas, ubicado en el centro del órgano. A nivel de la cabeza se sitúa en su parte posterior y se inclina hacia la derecha, describiendo una S itálica. Alcanza el colédoco en la proximidad de la pared duodenal y termina con él en la ampolla hepatopancreática. (LATARJET Y RUIZ, 2005).

Ésta se abre en el duodeno a través de la papila duodenal mayor. La determinación del conducto pancreático está rodeada por la porción pancreática del esfínter de la ampolla pancreática. Durante su trayecto recibe innumerables conductos que lo abordan por todas sus caras. Drena a los acinos de la cola, el cuerpo y la porción posterior de la cabeza del páncreas. (LATARJET Y RUIZ, 2005).

#### 2.2.3.3. Conducto pancreático de santorini

Se separa del conducto pancreático a nivel de la cabeza del páncreas. Se dirige en sentido horizontal hacia la derecha y termina atravesando la pared posteromedial del duodeno, a unos 2 o 3 cm por arriba del conducto pancreático principal. Su orificio levanta la mucosa formando la papila duodenal menor. Este conducto drena la porción anterior de la cabeza del páncreas (LATARJET Y RUIZ, 2005).

El páncreas es una glándula de secreción mixta.

- Su secreción externa, el jugo pancreático, es vertida en el duodeno por los conductos pancreáticos y pancreático accesorio.

- Su secreción interna (la insulina, el glucagón, la somatostatina y el polipéptido pancreático) se vierte en la sangre. Estas hormonas tienen una acción esencial en la regulación del metabolismo.

El páncreas se relaciona estrechamente con el duodeno, que enmarca su cabeza en el extremo derecho. Está íntimamente relacionado con el conducto colédoco. La porción izquierda del páncreas se afina en forma progresiva en dirección al bazo. Es un órgano profundo, adosado a la pared posterior del abdomen en una ubicación prevertebral, es retrogástrico y se relaciona por adelante con las regiones supracólicas e infracólicas del abdomen. La línea mediana deja un tercio del páncreas a la derecha y dos tercios a la izquierda. (LATARJET Y RUIZ, 2005).

#### 2.2.4. Histología del páncreas

El páncreas tiene una parte exocrina y una parte endocrina.

La parte exocrina está constituida por células epiteliales dispuestas en estructuras esféricas u ovoides huecas llamados acinos pancreáticos. Formados por las células acinosas y en parte por las centroacinosas.

La parte endocrina se agrupa en islotes de Langerhans, que consisten en cúmulos de células secretoras de hormonas que producen insulina, glucagón y somatostatina. Estos tipos de células son los siguientes:

##### 2.2.4.1. Células alfa

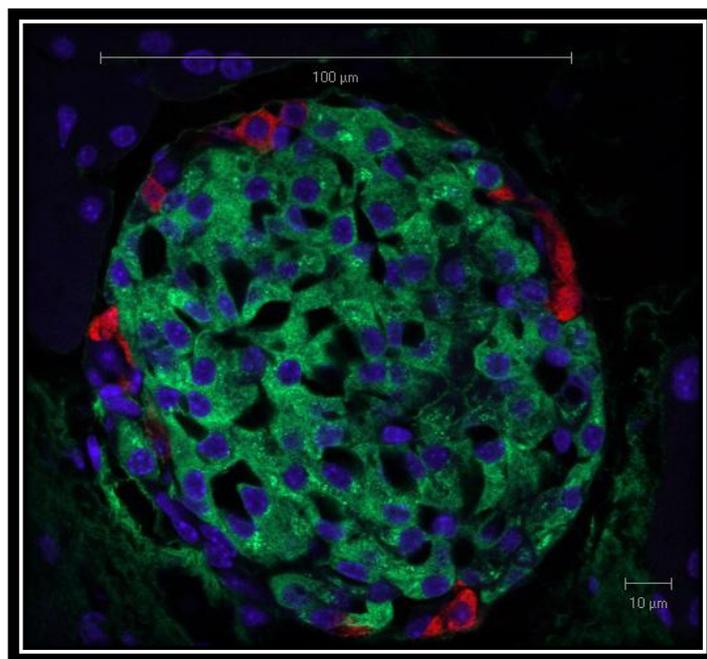
Sintetizan y liberan glucagón. El glucagón aumenta el nivel de glucosa sanguínea (hormona hiperglucemiante), al estimular la formación de este carbohidrato a partir del glucógeno almacenado en los hepatocitos. También ejerce efecto en el metabolismo de proteínas y grasas. La liberación del glucagón es inhibida por la hiperglucemia. Representan entre el 10 y el 20% del volumen del islote y se distribuyen de forma periférica. (LATARJET & RUIZ, 2005)

#### 2.2.4.2. Células beta

Las células beta son un tipo de célula del páncreas localizadas en los islotes de Langerhans. Sintetizan y segregan la insulina, una hormona que controla los niveles de glucosa en la sangre.

Las células beta fabrican insulina en etapas. La primera etapa es la producción de la proinsulina. La proinsulina es una molécula formada por una cadena proteínica de 81 aminoácidos, que es precursora de la insulina. Las células Beta del páncreas procesan la proinsulina convirtiéndola en insulina por la sustracción enzimática del péptido C, que es una estructura de 30 aminoácidos que conecta las cadenas A y B (de 21 y 30 aminoácidos, respectivamente). (LATARJET & RUIZ, 2005).

**FIGURA N° 2. 1 CÉCULA BETA**



**Fuente:** [http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A9lula\\_beta](http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A9lula_beta)

#### 2.2.4.3. Células delta

Las células delta producen somatostatina, hormona que inhibe la contracción del músculo liso del aparato digestivo y de la vesícula biliar cuando la digestión ha terminado. (LATARJET & RUIZ, 2005).

#### 2.2.4.4. Células F

Estas células producen y liberan el polipéptido pancreático que controla y regula la secreción exocrina del páncreas. (LATARJET & RUIZ, 2005).

La glucosa es la principal fuente de energía para el metabolismo de los seres humanos. Cuando hablamos de metabolismo nos referimos a todos esos procesos que ocurren en nuestras células y que son la base de la vida. La glucosa es un azúcar presente en los alimentos, particularmente en los carbohidratos, que pueden ir desde frutas y verduras, hasta dulces, bebidas gaseosas, nueces, cereales, pan, entre otros. (MAYORAL. L G M.D. M.S, 1998).

Parte de la glucosa que se obtiene de la digestión de los carbohidratos, se utiliza como energía para la realización de los procesos del cuerpo; la glucosa que no se utiliza, se almacena primordialmente en el hígado. Después de cada comida, el sistema nervioso detecta que hay alimento en el estómago y, a través de los nervios, manda señales eléctricas al páncreas para que libere sus enzimas al intestino y sus hormonas al torrente sanguíneo. (MAYORAL. L G M.D. M.S, 1998).

Una de estas hormonas, la insulina, es quien abre, a manera de llave, las puertas de las células para que la glucosa proveniente de los alimentos, entre y sirva como fuente de energía para todos los procesos. (MAYORAL. L G M.D. M.S, 1998).

La insulina es una de las sustancias producidas por el páncreas endocrino. La insulina pertenece al grupo de moléculas llamadas hormonas, que se caracterizan por ser sustancias que operan como mensajeros, al llevar información química por el torrente sanguíneo, desde el lugar donde se producen hasta uno más lejano. (MAYORAL. L G M.D. M.S, 1998).

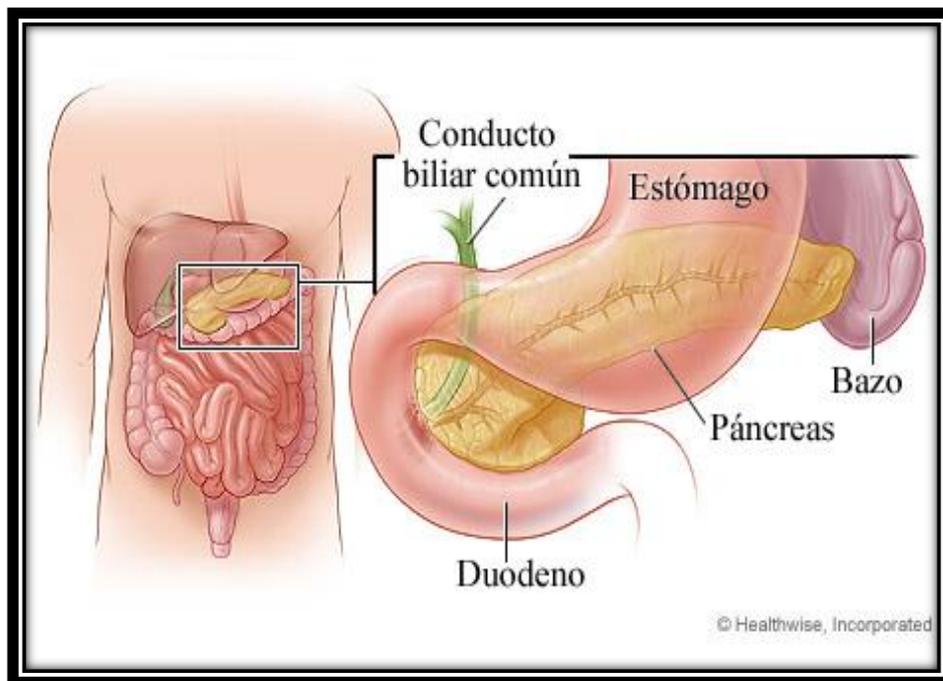
Como se mencionó, la insulina se encarga de ayudar al organismo a utilizar en las células o almacenar en el hígado, la glucosa que obtenemos a partir de los alimentos que ingerimos, por lo que juega un rol protagónico en mantener un adecuado equilibrio en el cuerpo. (MAYORAL. L G M.D. M.S, 1998).

En el caso contrario, es decir, cuando el páncreas detecta que los niveles de glucosa en la sangre son muy bajos, secreta otra de sus hormonas conocida como glucagón, que es la

encargada de ordenarle al hígado que libere parte de la glucosa que tiene almacenada. Es así como, mediante la acción contraria entre la insulina y el glucagón, el cuerpo se asegura de que los niveles de glucosa en la sangre se mantengan dentro de lo normal. (MAYORAL. L G M.D. M.S, 1998).

Cuando la insulina no es suficiente (por ejemplo, porque el páncreas no la está produciendo en cantidades adecuadas), la glucosa se acumula en el cuerpo, específicamente en la sangre, dando lugar a toda una serie de complicaciones que, en el largo plazo, pueden producir daños en el cuerpo y pueden disminuir significativamente la calidad de vida de las personas; a esa elevación de glucosa en la sangre, se le conoce como diabetes. (MAYORAL. L G M.D. M.S, 1998).

**FIGURA N° 2. 2 GENERALIDADES DEL PÁNCREAS**



**Fuente:** <http://www.uwhealth.org>

#### 2.2.5. Hidratos de carbono

Junto con grasa y proteína, son las principales fuentes de energía, siendo el alcohol (etanol) la otra fuente que adquiere significación de aporte energético en las dietas del mundo occidental. (HERNANDEZ R. 1999).

Bajo la denominación de hidratos de carbono, se incluyen, por una parte, los azúcares, a veces también llamados azúcares sencillos, que son monosacáridos (glucosa y fructosa) y disacáridos (sacarosa, maltosa y lactosa) y, por otra parte, los hidratos de carbono complejos polisacáridos que comprende el almidón fundamentalmente. (HERNANDEZ R. 1999).

No es posible establecer, en la mayoría de situaciones fisiológicas, los requerimientos en hidratos de carbono, dadas las peculiaridades metabólicas de los mismos. Piénsese que la glucosa absorbida en el intestino o producida por el hígado es una fuente energética clave para la mayor parte de tejidos, que otras hexosas como fructosa y galactosa se convierten en el hígado en glucosa y que gran número de aminoácidos, el glicerol y algunos ácidos orgánicos, pueden también transformarse en glucosa. (HERNANDEZ R. 1999).

#### 2.2.6. Ciclo de krebs

El ciclo de Krebs (también llamado ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarbónicos) es una ruta metabólica, es decir, una sucesión de reacciones químicas, que forma parte de la respiración celular en todas las células aeróbicas. En células eucariotas se realiza en la mitocondria. En las procariontas, el ciclo de Krebs se realiza en el citoplasma, específicamente en el citosol. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

El metabolismo comprende una serie de transformaciones químicas y procesos energéticos que ocurren en el ser vivo. Para que sucedan cada una de esas transformaciones se necesitan enzimas que originen sustancias que sean a su vez productos de otras reacciones. El conjunto de reacciones químicas y enzimáticas se denomina ruta o vía metabólica. El metabolismo se divide en:

El catabolismo es el metabolismo de degradación de sustancias con liberación de energía.

El anabolismo es el metabolismo de construcción de sustancias complejas con necesidad de energía en el proceso. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

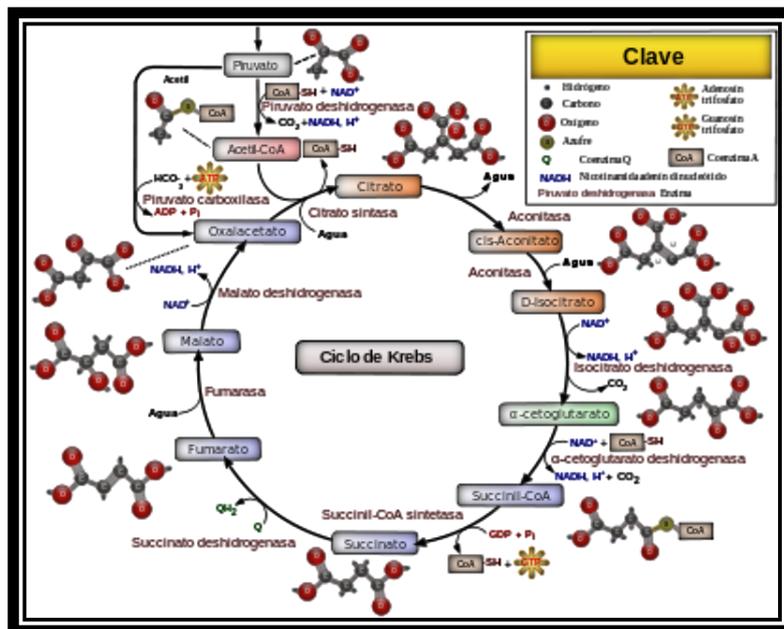
En las rutas metabólicas se necesitan numerosas y específicas moléculas que van conformando los pasos y productos intermedios de las rutas. Pero, además, son necesarios varios tipos de moléculas indispensables para su desarrollo final:

- Metabolitos (moléculas que ingresan en la ruta para su degradación o para participar en la síntesis de otras sustancias más complejas).
  - Nucleótidos (moléculas que permiten la oxidación y reducción de los metabolitos).
  - Moléculas energéticas (ATP y GTP o la Coenzima A que, al almacenar o desprender fosfato de sus moléculas, liberan o almacenan energía).
  - Moléculas ambientales (oxígeno, agua, dióxido de carbono, etc. que se encuentran al comienzo o final de algún proceso metabólico).
- (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

### 2.2.6.1. Reacciones del ciclo de krebs

El ciclo de Krebs tiene lugar en la matriz mitocondrial en eucariota. El acetil-CoA (Acetil Coenzima A) es el principal precursor del ciclo. El ácido cítrico (6 carbonos) o citrato se regenera en cada ciclo por condensación de un acetil-CoA (2 carbonos) con una molécula de oxaloacetato (4 carbonos). El citrato produce en cada ciclo una molécula de oxaloacetato y dos CO<sub>2</sub>, por lo que el balance neto del ciclo es:

**FIGURA N° 2. 3 REACCIÓN DEL CICLO DE KREBS**



Fuente: [http://es.wikipedia.org/wiki/Ciclo\\_de\\_Krebs](http://es.wikipedia.org/wiki/Ciclo_de_Krebs)

Los dos carbonos del Acetil-CoA son oxidados a CO<sub>2</sub>, y la energía que estaba acumulada es liberada en forma de energía química: GTP y poder reductor (electrones de alto potencial): NADH y FADH<sub>2</sub>. NADH y FADH<sub>2</sub> son coenzimas (moléculas que se unen a enzimas) capaces de acumular la energía en forma de poder reductor para su conversión en energía química en la fosforilación oxidativa. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

El FADH<sub>2</sub> de la succinato deshidrogenasa, al no poder desprenderse de la enzima, debe oxidarse nuevamente in situ. El FADH<sub>2</sub> cede sus dos hidrógenos a la ubiquinona (coenzima Q), que se reduce a ubiquinol (QH<sub>2</sub>) y abandona la enzima. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

#### 2.2.6.2. Etapas del ciclo de krebs

##### **Reacción 1: Citrato sintasa (De oxalacetato a citrato)**

El sitio activo de la enzima, activa el acetil-CoA para hacerlo afín a un centro carbonoso del oxalacetato. Como consecuencia de la unión entre las dos moléculas, el grupo tioéster (CoA) se hidroliza, formando así la molécula de citrato. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

La reacción es sumamente exoergónica ( $\Delta G'^{\circ} = -31.4$  kJ/mol), motivo por el cual este paso es irreversible. El citrato producido por la enzima, además, es capaz de inhibir competitivamente la actividad de la enzima. Incluso estando la reacción muy favorecida (porque es exoergónica), la citrato sintasa puede ser perfectamente regulada. Este aspecto tiene una notable importancia biológica, puesto que permite una completa regulación del ciclo de Krebs completo, convirtiendo a la enzima en una especie de marcapasos del ciclo. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

##### **Reacción 2: Aconitasa (De citrato a isocitrato)**

La aconitasa cataliza la isomerización del citrato a isocitrato, por la formación de cis-aconitato. La enzima cataliza también la reacción inversa, pero en el ciclo de Krebs tal reacción es unidireccional a causa de la ley de acción de masa: las concentraciones (en condiciones estándar) de citrato (91%), del intermediario cis-aconitato (3%) y de isocitrato

(6%), empujan decididamente la reacción hacia la producción de isocitrato. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

En el sitio activo de la enzima está presente un clúster hierro-azufre que, junto a algunos residuos de aminoácidos polares, liga el sustrato. En concreto, la unión al sustrato se asegura por la presencia de un resto de serina, de arginina, de histidina y de aspartato, que permiten sólo la unión estereoespecífica del citrato 1R, 2S, rechazando la forma opuesta. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

### **Reacción 3: Isocitrato deshidrogenasa (De isocitrato a oxoglutarato)**

La isocitrato deshidrogenasa mitocondrial es una enzima dependiente de la presencia de NAD<sup>+</sup> y de Mn<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup>. Inicialmente, la enzima cataliza la oxidación del isocitrato a oxalsuccinato, lo que genera una molécula de NADH a partir de NAD<sup>+</sup>. Sucesivamente, la presencia de un ión bivalente, que forma un complejo con los oxígenos del grupo carboxilo en posición alfa, aumenta la electronegatividad de esa región molecular. Esto genera una reorganización de los electrones en la molécula, con la consiguiente rotura de la unión entre el carbono en posición gamma y el grupo carboxilo adyacente. De este modo se tiene una descarboxilación, es decir, la salida de una molécula de CO<sub>2</sub>, que conduce a la formación de  $\alpha$ -cetoglutarato, caracterizado por dos carboxilos en las extremidades y una cetona en posición alfa con respecto de uno de los dos grupos carboxilo. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

### **Reacción 4: $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (De oxoglutarato a Succinil-CoA)**

Después de la conversión del isocitrato en  $\alpha$ -cetoglutarato se produce una segunda reacción de descarboxilación oxidativa, que lleva a la formación de succinil CoA. La descarboxilación oxidativa del  $\alpha$ -cetoglutarato es muy parecida a la del piruvato, otro  $\alpha$ -cetoácido. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

Ambas reacciones incluyen la descarboxilación de un  $\alpha$ -cetoácido y la consiguiente producción de una unión tioéster a alta energía con la coenzima A. Los complejos que catalizan tales reacciones son parecidos entre ellos.

La  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (o, más correctamente, oxoglutarato deshidrogenasa), está compuesta de tres enzimas diferentes

- Subunidad E1: las dos cetoglutarato deshidrogenasas.
- Subunidad E2: la transuccinilasa.
- (La subunidad E1 y E2 presentan una gran homología con las de la piruvato deshidrogenasa.)
- Subunidad E3: la dihidrolipoamida deshidrogenasa, que es el mismo polipéptido presente en el otro complejo enzimático. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

### **Reacción 5: Succinil-CoA sintetasa (De Succinil-CoA a succinato)**

El succinil-CoA es un tioéster a alta energía (su  $\Delta G^\circ$  de hidrólisis está en unos  $-33.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ , parecido al del ATP que es de  $-30.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). El citrato sintasa se sirve de un intermediario con tal unión a alta energía para llevar a cabo la fusión entre una molécula con dos átomos de carbono (acetil-CoA) y una con cuatro (oxalacetato). La enzima succinil-CoA sintetasa se sirve de tal energía para fosforilar un nucleósido difosfato purínico como el GDP. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

La energía procedente del tioéster viene convertida en energía ligada a una unión fosfato. El primer paso de la reacción genera un nuevo intermediario a alta energía, conocido como succinil fosfato. Sucesivamente, una histidina presente en el sitio catalítico remueve el fosfato de la molécula glucídica, generando el producto succinato y una molécula de fosfohistidina, que dona velozmente el fosfato a un nucleósido difosfato, recargándolo a trifosfato. Se trata del único paso del ciclo de Krebs en el que se produce una fosforilación a nivel de sustrato. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

El GTP está implicado principalmente en las rutas de transducción de señales, pero su papel en un proceso energético como el ciclo de Krebs es, en cambio, esencialmente trasladar grupos fosfato hacia el ATP, en una reacción catalizada por la enzima nucleósido difosfoquinasa. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

### **Reacción 6: Succinato deshidrogenasa (De succinato a fumarato)**

La parte final del ciclo consiste en la reorganización de moléculas a cuatro átomos de carbono hasta la regeneración del oxalacetato. Para que eso sea posible, el grupo metilo presente en el succinato tiene que convertirse en un carbonilo. Como ocurre en otras rutas, por ejemplo en la beta oxidación de los ácidos grasos, tal conversión ocurre mediante tres pasos: una primera oxidación, una hidratación y una segunda oxidación. Estos tres pasos, además de regenerar oxalacetato, permiten la extracción ulterior de energía mediante la formación de FADH<sub>2</sub> y NADH. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

La primera reacción de oxidación es catalizada por el complejo enzimático de la succinato deshidrogenasa, la única enzima del ciclo que tiene como aceptor de hidrógeno al FAD en vez de al NAD<sup>+</sup>. El FAD es enlazado de modo covalente a la enzima por un residuo de histidina. La enzima se vale del FAD ya que la energía asociada a la reacción no es suficiente para reducir el NAD<sup>+</sup>. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

El complejo enzimático también es el único del ciclo que pasa dentro de la membrana mitocondrial. Tal posición se debe a la implicación de la enzima en la cadena de transporte de los electrones. Los electrones pasados sobre el FAD se introducen directamente en la cadena gracias a la unión estable entre la enzima y el cofactor mismo. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

### **Reacción 7: Fumarasa (De fumarato a L-malato)**

La fumarasa cataliza la adición en trans de un protón y un grupo OH<sup>-</sup> procedentes de una molécula de agua. La hidratación del fumarato produce L-malato. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

### **Reacción 8: Malato deshidrogenasa (De L-malato a oxalacetato)**

La última reacción del ciclo de Krebs consiste en la oxidación del malato a oxalacetato, la reacción, catalizada por la malato deshidrogenasa, utiliza otra molécula de NAD<sup>+</sup> como aceptor de hidrógeno, produciendo NADH. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

La energía libre de Gibbs asociada con esta última reacción es decididamente positiva, a diferencia de las otras del ciclo. La actividad de la enzima es remolcada por el consumo de oxalacetato por parte del citrato sintasa, y de NADH por parte de la cadena de transporte de electrones. (<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>).

#### 2.2.7. Péptido C

Es una cadena de proteínas, que resultan del proceso de fabricación de insulina de las células beta. Durante este proceso, se divide otra molécula conocida como proinsulina y da como resultado: insulina y Péptido-C. Por cada molécula de insulina que producen nuestras células beta se produce una molécula de Péptido-C. (MAYORAL L. G. M.D. M.S, 1998).

El análisis de péptido-C, se utiliza para medir la producción de insulina de las células beta del páncreas y en ocasiones para ayudarnos a encontrar las causas de una hipoglucemia. (MAYORAL L. G. M.D. M.S, 1998).

El péptido C y la insulina son secretados a la circulación portal en concentraciones equimoleculares. En la circulación periférica el nivel de péptido C es mayor que el nivel de insulina debido a que su vida media es más larga. Las concentraciones de péptido C son un mejor indicador del funcionamiento de las células beta que la concentración periférica de insulina. (<http://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha070.htm>).

Además, las determinaciones de péptido C no miden insulina exógena, razón por la cual el péptido C se mide para diferenciar la insulina producida por el cuerpo de la insulina inyectada en el organismo y no reacciona de manera cruzada con los anticuerpos anti-insulina, los cuales interfieren con los inmunoensayos para determinar insulina.

Investigaciones recientes sugieren que el péptido C, que anteriormente era considerado un producto de desecho, tiene propiedades terapéuticas ya que puede jugar un papel en la prevención o atenuación de algunas de las complicaciones vasculares y neurológicas de la diabetes. (<http://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha070.htm>)

La indicación primaria para la determinación de los niveles de péptido C es la evaluación de la hipoglicemia en ayunas, para determinar si el cuerpo del paciente está produciendo

demasiada insulina. También, el nivel de péptido C se puede medir en un paciente con diabetes tipo II para comprobar si el cuerpo aún está produciendo insulina.

En general, los niveles de péptido C se correlacionan muy bien con los niveles de insulina en sangre, excepto en los tumores de células del islote y en pacientes obesos. Algunos individuos con insulinomas, tumores de células beta que producen insulina, particularmente si el hiperinsulinismo es intermitente, pueden mostrar aumentos en las concentraciones de péptido C con concentraciones normales de insulina. En los pacientes con un insulinoma secretor autónomo, los niveles de péptido C no son suprimidos. Más aún, el péptido C puede ser usado para monitorear los pacientes con insulinoma que están siendo tratados. Una elevación en los niveles de péptido C indica una recurrencia o progreso del insulinoma. (<http://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha070.htm>)

La capacidad de las células beta del páncreas para secretar insulina puede ser evaluada ya sea midiendo los niveles de insulina o los de péptido C. En algunas circunstancias la determinación directa de insulina no evalúa con exactitud la capacidad de una paciente de producir insulina. Los niveles de péptido C reflejan con más exactitud las funciones celulares del islote en las situaciones siguientes:

- Pacientes con diabetes que están siendo tratados con insulina y que poseen anticuerpos anti-insulina. Estos anticuerpos aumentan falsamente los niveles de insulina.
- Pacientes que se auto administran insulina secretamente (hipoglicemia facticia). Los niveles de insulina estarán elevados. Las determinaciones directas de insulina en estos pacientes tienden a ser elevadas debido a que la insulina medida es insulina exógena autoadministrada. En cambio los niveles de péptido C en la misma muestra serán bajos debido a que la insulina exógena administrada suprime la producción de insulina endógena (y de péptido C). Estas diferencias ocurren debido a que el péptido C no se encuentra en las preparaciones comerciales de insulina.
- Pacientes diabéticos que están usando insulina. La insulina administrada de manera exógena suprime la producción endógena de insulina. Los niveles de insulina solo miden la insulina administrada de manera exógena y no reflejan con exactitud el funcionamiento real de las células del islote. El péptido C sería una prueba más exacta del funcionamiento de las células de los islotes. Esta se realiza para ver si la

diabetes está en remisión y si es posible que el paciente no necesite insulina exógena. (<http://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha070.htm>)

#### 2.2.7.1. Interpretación de los resultados del test de péptido- C

Niveles altos de Péptido-C, normalmente nos indican un nivel alto de producción de insulina por nuestras células beta. Esto puede ser como respuesta a niveles elevados de glucosa como resultado de una gran ingesta de alimentos o por resistencia a la insulina. MAYORAL LUIS G, M.D., M.S (1998).

Niveles muy elevados de Péptido-C también pueden ser vistos en presencia de otros padecimientos o situaciones como: insulinomas, ciertos casos de hipokalemia, embarazo, Síndrome de Cushing e insuficiencia renal. MAYORAL LUIS G, M.D., M.S (1998).

Niveles bajos de Péptido-C se asocian con niveles bajos de producción de insulina, y esto se observa normalmente cuando ya la célula beta produce poca insulina o cuando la producción de insulina se encuentra suprimida por insulina inyectada. Cadena de aminoácidos (péptido) que forma parte de la proinsulina. No confundir péptido C con proteína C reactiva ni con proteína C. La proinsulina es una proteína que al ser procesada forma la insulina. El péptido C es escindido en el procesamiento de la proinsulina a insulina por lo que no forma parte de esta última. MAYORAL LUIS G, M.D., M.S (1998).

#### 2.2.8. La insulina

La insulina es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos, producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. La insulina interviene en el aprovechamiento metabólico de los nutrientes, sobre todo con el anabolismo de los glúcidos. Su déficit provoca la diabetes mellitus y su exceso provoca hiperinsulinismo con hipoglucemia. La síntesis de la insulina pasa por una serie de etapas. Primero la preproinsulina es creada por un ribosoma en el retículo endoplasmático rugoso (RER), que pasa a ser (cuando pierde su secuencia señal) proinsulina.

Esta es importada al aparato de Golgi, donde se modifica, eliminando una parte y uniendo los dos fragmentos restantes mediante puentes disulfuro. Gran número de estudios

demuestran que la insulina es una alternativa segura, efectiva, bien tolerada y aceptada para el tratamiento a largo plazo de la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2, incluso desde el primer día del diagnóstico. (BONNADONNA RC, DEL PRATO S, RATHEISER K. 1996).

Frederick Grant Banting, Charles Best, James Collip, y J.J.R. Macleod de la Universidad de Toronto, Canadá, descubrieron la insulina en 1922. El Doctor Banting recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por descubrir esta hormona aunque se demostró que el verdadero descubridor fue Nicolae Paulescu en 1921.

La insulina es una hormona "Anabólica" por excelencia: permite disponer a las células del aporte necesario de glucosa para los procesos de síntesis con gasto de energía. De esta manera, mediante glucólisis y respiración celular se obtendrá la energía necesaria en forma de ATP. Su función es la de favorecer la incorporación de glucosa de la sangre hacia las células: actúa siendo la insulina liberada por las células beta del páncreas cuando el nivel de glucosa en sangre es alto. El glucagón, al contrario, actúa cuando el nivel de glucosa disminuye y es entonces liberado a la sangre. (BONNADONNA RC, DEL PRATO S, RATHEISER K. 1996).

Por su parte, la Somatostatina, es la hormona encargada de regular la producción y liberación tanto de glucagón como de insulina. La insulina se produce en el Páncreas en los "Islotes de Langerhans", mediante unas células llamadas Beta. Una manera de detectar si las células beta producen insulina, es haciendo una prueba, para ver si existe péptido C en sangre. El péptido C se libera a la sangre cuando las células Beta procesan la proinsulina, convirtiéndola en insulina. Cuando sólo entre un 10 % y un 20 % de las células Beta están en buen estado, comienzan a aparecer los síntomas de la diabetes, pasando primero por un estado previo denominado luna de miel, en el que el páncreas aún segrega algo de insulina.

La insulina tiene una importante función reguladora sobre el metabolismo, sobre el que tiene los siguientes efectos:

- Estimula la glucogenogénesis.
- Inhibe la glucogenólisis.
- Disminuye la glucosecreción hepática.

- Promueve la glucólisis.
- Estimula la síntesis de proteínas.

Favorece la síntesis de triacilgliceroles (triglicéridos). Para ello, estimula la producción de acetil-CoA (p.ej. al acelerar la glucólisis), y también estimula la síntesis de ácidos grasos (componentes de los triacilgliceroles) a partir de la acetil-CoA.

#### 2.2.8.1. Síntesis

La insulina se sintetiza en las células beta del páncreas y se libera bajo la influencia de varios estímulos, entre ellos, la ingesta de proteínas y glucosa y su paso a la sangre a partir de los alimentos digeridos. Muchos carbohidratos producen glucosa, aumentando sus niveles en el plasma sanguíneo y estimulando de inmediato la liberación de insulina a la circulación portal. También se ha demostrado que la hormona de crecimiento es capaz de aumentar la secreción de insulina humana. (BONNADONNA RC, DEL PRATO S, RATHEISER K. 1996).

En las células diana -principalmente en el hígado, músculo y tejido adiposo-, se inicia una transducción de señales cuyo efecto es el incremento en la captación de glucosa y su posterior almacenamiento, evitando así un ascenso excesivo de la glucemia postprandial. Con la reducción de la concentración circulante de glucosa, se degrada la insulina secretada, finalizando así la respuesta unas 2 o 3 horas después de la ingesta.

La porción exocrina del páncreas está conformada por Acinos serosos que representan la mayor parte de la masa de la glándula. Las células beta hacen parte de los islotes de Langerhans (Las células beta son el 70 % de todas las células endocrinas) que constituyen la porción endocrina del páncreas (2 % de todo el parénquima), haciendo entonces que el páncreas sea fundamentalmente una glándula mixta.

En las células beta, la insulina se sintetiza a partir de proinsulina, una molécula precursora, por acción de enzimas proteolíticas conocidas como convertasas prohormonas, específicamente la convertasa proproteína 1 y la convertasa proproteína 2, así como la exoproteasa carboxipeptidasa. (MAYORAL L. G. M.D. M.S, 1998).

Ciertas modificaciones ejercidas sobre la proinsulina le eliminan una región del centro de la molécula denominada péptido C quedando libres los extremos C-terminal y N-terminal.

Estos extremos libres tienen 51 aminoácidos en total y se denominan cadenas A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos), los cuales terminan unidas entre sí por medio de enlaces disulfuro. De modo que la proinsulina consta de las cadenas B-C-A y los gránulos secretorios liberan las tres cadenas simultáneamente. La producción endógena de insulina es regulada en varios pasos a lo largo de una ruta sintética. (MAYORAL L. G. M.D. M.S, 1998).

Primero sobre la transcripción del ADN, específicamente a nivel del gen de la insulina. Luego a nivel de la estabilidad del ARNm y a nivel de la traducción del ARNm. Finalmente, también se regula a nivel de las modificaciones postraduccionales. Se ha demostrado que la insulina y sus proteínas relacionadas son producidas también dentro del cerebro y que niveles muy reducidos de estas proteínas pueden estar asociadas a la enfermedad de Alzheimer. (MAYORAL L. G. M.D. M.S, 1998).

#### 2.2.8.2. Liberación de la insulina

Las células beta de los islotes de Langerhans liberan la insulina en dos fases. La primera fase de la liberación de insulina se desencadena rápidamente en respuesta al aumento de los niveles de glucosa en la sangre. La segunda fase produce una liberación sostenida y lenta de las recién formadas vesículas que se activan independientemente de la cantidad de azúcar en la sangre.

En la primera fase la liberación de la insulina ocurre de manera inmediata:

- La glucosa entra en las células beta a través del transportador de glucosa GLUT2.
- La glucosa pasa a la glucólisis y el ciclo respiratorio, donde se producen, por oxidación, varias moléculas de ATP de alta energía.
- Los canales de potasio ( $K^+$ ) dependientes de los niveles de ATP y, por tanto, de los niveles de glucosa en sangre, se cierran y la membrana celular se despolariza.
- Con la despolarización de la membrana, los canales de calcio ( $Ca^{2+}$ ) dependientes de voltaje se abren y el calcio entra la célula.
- Un aumento en el nivel de calcio intracelular produce la activación de fosfolipasa C, que desdobla los fosfolípidos de membrana fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato en inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol.
- El inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) se une a los receptores proteicos sobre la membrana del retículo endoplásmico (RE). Esto permite la liberación de  $Ca^{2+}$  del

RE a través de los canales IP3 aumentando más aún la concentración intracelular de calcio.

- Estas cantidades significativamente mayores de calcio dentro de las células provoca la activación de la sinaptotagmina, que ayuda a la liberación de la insulina previamente sintetizada y almacenada en las vesículas secretoras.

Este es el principal mecanismo para la liberación de insulina. Cierta liberación de insulina ocurre además con la ingesta de alimentos, no sólo de glucosa o hidratos de carbono, y las células beta son también en cierta medida influenciadas por el sistema nervioso autónomo. Los mecanismos de señalización que controlan estos vínculos no son del todo comprendidos. (RANGEL F.E.E., MORALES DE CERDA G. 2007).

Otras sustancias que pueden estimular la liberación de insulina incluyen los aminoácidos de las proteínas ingeridas, la acetilcolina -liberada de las terminaciones nervio vago (sistema nervioso parasimpático)-, la colecistoquinina -secretada por células enteroendocrinas de la mucosa intestinal, y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). Tres aminoácidos (alanina, glicina y arginina) actúan de manera similar a la glucosa alterando el potencial de membrana de la célula beta. La acetilcolina desencadena la liberación de insulina a través de la fosfolipasa C, mientras que la colecistoquinina actúa a través del mecanismo de adenilato ciclasa. (RANGEL F.E.E., MORALES DE CERDA G. 2007).

El sistema nervioso simpático, a través de la estimulación de receptores adrenérgicos alfa 2, como lo demuestran los agonistas de la clonidina o la alfametildopa, inhiben la liberación de insulina. Sin embargo, cabe señalar que la adrenalina circulante activará los receptores Beta 2 en las células beta de los islotes pancreáticos para promover la liberación de insulina. (RANGEL F.E.E., MORALES DE CERDA G. 2007).

Esto es importante ya que los músculos no pueden beneficiarse de los incrementos de glucosa en la sangre como consecuencia de la estimulación adrenérgica (aumento de la gluconeogénesis y glucogenólisis con los niveles bajos de la insulina en sangre: por el glucagón) a menos que la insulina está presente para permitir la translocación GLUT-4 a nivel de los tejidos. (BONNADONNA RC, DEL PRATO S, RATHEISER K. 1996).

Por lo tanto, comenzando con la inervación directa, la noradrenalina inhibe la liberación de insulina a través de los receptores alfa 2 y, subsecuentemente, la adrenalina circulante proveniente de la médula suprarrenal estimulará los receptores beta 2, promoviendo así la liberación de insulina. (RANGEL F.E.E., MORALES DE CERDA G. 2007).

Cuando el nivel de glucosa se reduce al valor fisiológico normal, la liberación de insulina de las células beta frena o se detiene. (RANGEL F.E.E., MORALES DE CERDA G. 2007).

Si los niveles de glucosa en sangre se vuelven inferior a ese nivel, especialmente a niveles peligrosamente bajos, la liberación de hormonas hiperglicémicas, la más prominente de las cuales es el glucagón de los mismos islotes de Langerhans pero de células alfa, obligan a la liberación de glucosa en la sangre a partir de los almacenes celulares, principalmente el almacenamiento de glucógeno en las células del hígado. (RANGEL F.E.E., MORALES DE CERDA G. 2007).

Mediante el aumento de glucosa en la sangre, las hormonas hiperglucémicas previenen o corrigen la hipoglucemia que pone en peligro la vida del individuo. La liberación de insulina está fuertemente inhibida por la hormona del estrés noradrenalina, lo que conduce a un aumento de los niveles de glucosa en sangre durante momentos de estrés. Pruebas de alteración de la primera fase de liberación de insulina se pueden detectar en la prueba de tolerancia a la glucosa, demostrado por una sustancial elevación de nivel de glucosa en sangre en los primeros 30 minutos, un marcado descenso durante los siguientes 60 minutos, y un constante ascenso de nuevo a los niveles de referencia en las siguientes horas. (RANGEL F.E.E., MORALES DE CERDA G. 2007).

#### 2.2.9. La Glucogénesis

La glucogénesis es la ruta anabólica por la que tiene lugar la síntesis de glucógeno (también llamado glicógeno) a partir de un precursor más simple, la glucosa-6-fosfato. Se lleva a cabo principalmente en el hígado, y en menor medida en el músculo. El glucógeno se forma por la incorporación repetida de unidades de glucosa, ofrecida al sistema de forma de UDP-Glucosa a una semilla de glucógeno preexistente (glucogenina), que no es menor de 4 moléculas de glucosa unidas entre sí. El único alimento de la vía

glucogénica (glucogénesis) es la glucosa-6-fosfato. (BONNADONNA RC, DEL PRATO S, RATHEISER K. 1996).

La glucogénesis es estimulada por la hormona insulina, secretada por las células  $\beta$  (beta) de los islotes de Langerhans del páncreas y es inhibida por su contrarreguladora, la hormona glucagón, secretada por las células  $\alpha$  (alfa) de los islotes de Langerhans del páncreas, que estimula la ruta catabólica llamada glucogenólisis para degradar el glucógeno almacenado y transformarlo en glucosa y así aumentar la glicemia (azúcar en sangre).

Desde el punto de vista enzimático, producir glucosiliosas desde lacticosinidas cuesta más de lo que produjo su degradación fosfórica. *La ecuación extrafundamental* es:  $2 \text{ ac. piruviconio} + 4 \text{ ATP} + 2 \text{ ADP} + 9 \text{ NADH} + 7 \text{ H} + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glucosa} + 4 \text{ ADP} + 2 \text{ GDP} + 6 \text{ P} + 2 \text{ NAD}^+$

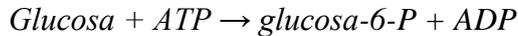
El proceso de Glucogénesis, también conocido como combustión de glucosa, se lleva a cabo en la matriz extracelular del tejido epitelial. La glucogenogénesis es la ruta anabólica por la que tiene lugar la síntesis de glucógeno (también llamado glicógeno) a partir de un precursor más simple, la glucosa-6-fosfato. Se lleva a cabo principalmente en el hígado, y en menor medida en el músculo, es activado por insulina en respuesta a los altos niveles de glucosa, que pueden ser (por ejemplo) posteriores a la ingesta de alimentos con carbohidratos. (RANGEL F.E.E., MORALES DE CERDA G. 2007).

Se forma por la incorporación repetida de unidades de glucosa, la que llega en forma de UDP-Glucosa a un partidor de glucógeno preexistente que consiste en la proteína glucogenina, formada por 2 cadenas, que al autoglicosilarse puede unir cada una de sus cadenas a un octámero de glucosas. Para que la *glucosa-6-fosfato* pueda unirse a la *UDP* requiere de la participación de dos enzimas, la primera, fosfoglucomutasa, modifica la posición del fosfato a *glucosa-1-fosfato*.

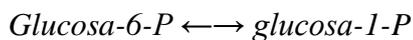
La *glucosa-fosfato* es el precursor para la síntesis de glucógeno pero también es el producto de su degradación. La síntesis de glucógeno requiere de aporte energético. El dador de glucosa para la síntesis de glucógeno es la UDP-glucosa donde el residuo glucosilo está activado para su transferencia, por su combinación con un compuesto de alta energía como el UTP. (BONNADONNA RC, DEL PRATO S, RATHEISER K. 1996).

### 2.2.9.1. Proceso de la glucogénesis

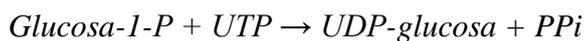
- La Glucosa se convierte en glucosa-6-fosfato mediante una reacción irreversible catalizada por la glucoquinasa o hexoquinasa dependiendo del tejido en cuestión.



- Glucosa-6-fosfato se convierte en glucosa-1-fosfato por la acción de la Fosfoglucomutasa, mediante la formación obligada de un compuesto intermediario, glucosa-1,6-bisfosfatasa.



- Glucosa-1-fosfato se convierte en UDP-glucosa por la acción de la UDP-glucosa pirofosforilasa (llamada también uridil transferasa).



- Las moléculas de glucosa son acopladas en cadena por la glucógeno sintasa, este paso debe realizarse sobre un primer preexistente de glucógeno, es decir, la glucógeno sintasa actúa formando alargamientos lineales de ramas preexistentes, solamente formando uniones  $\alpha$ 1-4 permitiendo la unión de glucosa a glucógeno preexistente.
- Las ramificaciones son producidas por la enzima ramificadora del glucógeno, la cual transfiere un fragmento de 6 a 8 unidades del extremo no reductor y lo une a una glucosa por un enlace  $\alpha$ -1,6. Esto posibilita que ambas cadenas puedan continuar alargándose mediante uniones  $\alpha$ -1,4 de glucosas hasta poder producir nuevas ramificaciones.
- Es la vía generadora de glucógeno.

### 2.2.10. Gluconeogénesis

Es una ruta metabólica anabólica, que permite la biosíntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos. Incluye la utilización de varios aminoácidos, lactato piruvato, glicerol y cualquiera de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (o ciclo de Krebs) como fuentes de carbono para la vía metabólica. (MAYORAL L. G, M.D. M.S, 1998)

Todos los aminoácidos, excepto la leucina y la lisina, pueden suministrar carbono para la síntesis de glucosa. Los ácidos grasos de cadena par no proporcionan carbonos para la síntesis de glucosa, pues el resultado de su  $\beta$ -oxidación (Acetil-CoA) no es un sustrato gluconeogénico. (BONNADONNA RC, DEL PRATO S, RATHEISER K. 1996)

Mientras que los ácidos grasos de cadena impar proporcionarán un esqueleto de carbonos que derivarán en Acetil-CoA y Succinil-CoA (que sí es un sustrato gluconeogénico por ser un intermediario del ciclo de Krebs).

Algunos tejidos, como el cerebro, los eritrocitos, el riñón, la córnea del ojo y el músculo, cuando el individuo realiza actividad extenuante, requieren de un aporte continuo de glucosa, obteniéndola a partir del glucógeno proveniente del hígado, el cual solo puede satisfacer estas necesidades durante 10 a 18 horas como máximo, lo que tarda en agotarse el glucógeno almacenado en el hígado. Posteriormente comienza la formación de glucosa a partir de sustratos diferentes al glucógeno.

La gluconeogénesis tiene lugar casi exclusivamente en el hígado (10% en los riñones), es un proceso clave pues permite a los organismos superiores obtener glucosa en estados metabólicos como el ayuno. Las enzimas que participan en la vía glucolítica participan también en la gluconeogénesis; ambas rutas se diferencian por tres reacciones irreversibles que utilizan enzimas específicas de este proceso y los dos rodeos metabólicos de esta vía. (BONNADONNA RC, DEL PRATO S, RATHEISER K. 1996).

Estas reacciones son:

- De glucosa a glucosa-6-fosfato.
- De fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato.
- De fosfoenolpiruvato a piruvato.

#### 2.2.11. Glucólisis

La glucólisis o glicólisis (del griego *glycos*, azúcar y *lysis*, ruptura), es la vía metabólica encargada de oxidar la glucosa con la finalidad de obtener energía para la célula. Consiste en 10 reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato, el cual es capaz de seguir otras vías metabólicas y así continuar entregando energía al organismo. El tipo de glucólisis más común y más

conocida es la vía de Embden-Meyerhof, explicada inicialmente por Gustav Embden y Otto Meyerhof. (BONNADONNA RC, DEL PRATO S, RATHEISER K. 1996).

El término puede incluir vías alternativas, como la vía de Entner-Doudoroff. No obstante, glucólisis se usa con frecuencia como sinónimo de la vía de Embden-Meyerhof. Es la vía inicial del catabolismo (degradación) de carbohidratos.

#### 2.2.12. Diabetes

La diabetes mellitus es una enfermedad compleja, multicausal, caracterizada por una insuficiencia absoluta o relativa de insulina que conduce, como hecho principal de las repercusiones metabólicas, a hiperglucemia. El fundamento de las alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas es la deficiente acción de la insulina en los órganos diana. (BALADA, MARQUÉZ, NADAL, REDOLAR, & SILVESTRE, Farmacología y Endocrinología del Comportamiento, 2012).

La deficiente acción de la insulina es el resultado de una inadecuada secreción y/o una respuesta tisular ineficaz a nivel de uno o más puntos del complejo dispositivo de la acción hormonal. Los síntomas de una hiperglucemia importante incluyen la poliuria, la polidipsia, a veces la polifagia, la pérdida de peso y la visión borrosa. Las complicaciones agudas son la hiperglucemia con cetoacidosis y el síndrome hiperosmolar no cetósico. (BALADA, MARQUÉZ, NADAL, REDOLAR, & SILVESTRE, Farmacología y Endocrinología del Comportamiento, 2012).

##### ➤ Factores de riesgo y prevención.

En el intento de comprender la influencia de los factores de riesgo para diabetes, es necesario plantear un método epidemiológico que pueda utilizarse para evaluar la atención a grupos específicos, determinar un grado de atención en salud, definir las necesidades de reorganización y mejorar la atención proporcionada a quienes más lo requieren. (BALADA, MARQUÉZ, NADAL, REDOLAR, & SILVESTRE, 2012)

Con base a los indicadores de la enfermedad puede saberse cuántas personas enfermarán o morirán por diabetes, pero no cuántas experimentarán los daños producidos por la

enfermedad. Aún con ello, es factible estandarizar factores de riesgo para la diabetes entre la población. . (BALADA, MARQUÉZ, NADAL, REDOLAR, & SILVESTRE, 2012).

Estos factores de riesgo combinan los conceptos clásicos de etiología directa del padecimiento con otros, más recientes, sobre probabilidad, predicción y pronóstico, sin descartar la importancia de un juicio clínico adecuado y un correcto ejercicio de la prevención. Así pues, los factores de riesgo para la diabetes han sido clasificados en factores modificables y no modificables. (BALADA, MARQUÉZ, NADAL, REDOLAR, & SILVESTRE, 2012).

#### 2.2.12.1. Factores de riesgo no modificables

- Antecedentes de diabetes mellitus en un familiar de primer grado(padres, hermanos e hijos)
- Ascendencia hispánica
- Edad 45 años.
- Haber tenido un hijo macrosónico.

En países en los que la ascendencia hispánica es significativamente mayoritaria, este criterio no es de inclusión. Este factor no es válido sólo en países con comportamiento étnico heterogéneo. (BALADA, MARQUÉZ, NADAL, REDOLAR, & SILVESTRE, 2012).

#### 2.2.12.2. Factores de riesgo modificables

Son los que mayor preocupación causa al médico en su ejercicio diario, ya que una acción directa sobre ellos disminuye la probabilidad de que la enfermedad se manifieste. (BALADA, MARQUÉZ, NADAL, REDOLAR, & SILVESTRE, 2012).

Las acciones directas permiten también que pueda retardarse su aparición y se modifique la evolución desfavorable para el desarrollo de las complicaciones microvasculares y macrovasculares. (BALADA, MARQUÉZ, NADAL, REDOLAR, & SILVESTRE, 2012).

- Cifras de HDL > a 35 mg/dl
- Cuenta de triglicéridos > a 150 mg/dl
- Estilo de vida contrario a la salud.
- Hábitos inadecuados de alimentación.

- Índice de masa corporal > a 27kg/m<sup>2</sup> (hombres) y > a 25kg/m<sup>2</sup>(mujeres)
- Manejo inadecuado del estrés
- Obesidad
- Presión arterial >140/90mmHg
- Sedentarismo
- Tabaquismo

#### 2.2.12.3. Clasificación

La clasificación previa agrupaba bajo el término diabetes, alteraciones que difieren marcadamente en su patogénesis, evolución natural, respuesta terapéutica y prevención. A esto se agregan distintos factores genéticos y del medio ambiente que conducen a formas de diabetes que parecen fenotípicamente similares pero que pueden tener etiologías distintas.

- Diabetes insulino dependiente o tipo I
- Diabetes no insulino dependiente, tipo II
- Diabetes gestacional

#### 2.2.12.4. Diabetes Mellitus Tipo I

La Diabetes Mellitus es una enfermedad en la que los niveles de glucosa en la sangre (azúcar en la sangre) están por encima de los valores normales. A las personas con Diabetes Mellitus les cuesta trabajo convertir los alimentos en energía. Después de una comida, los alimentos se descomponen para producir un azúcar llamado glucosa, que es transportado por la sangre a las células de todo el cuerpo. Las células utilizan una hormona llamada insulina, que se produce en el páncreas, para convertir la glucosa de la sangre en energía. (GILARTE C. PERRONE, M. 2005)

Llega un momento en que el páncreas no puede producir suficiente insulina para satisfacer las necesidades del cuerpo. Como resultado, la cantidad de glucosa en la sangre aumenta a medida que las células no reciben energía. Con el paso de los años, los niveles altos de glucosa en la sangre dañan los nervios y los vasos sanguíneos, provocando complicaciones como enfermedades del corazón, apoplejías (derrame cerebral), ceguera, enfermedad renal, problemas de los nervios, infecciones de las encías y amputaciones. (NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2006)

En los pacientes con Diabetes Mellitus tipo I la secreción de insulina endógena es mínima o nula. Los sujetos afectados son muy propensos a la cetosis, y es frecuente que sea un episodio de cetoacidosis diabética el que lleve al enfermo a buscar tratamiento. Esta forma de la enfermedad se denomina también Diabetes Mellitus autoinmune. (GILARTE C. PERRONE, M. 2005)

Antes del inicio de los síntomas, esta enfermedad comienza a estar presente con una serie de alteraciones inmunológicas o marcadores inmunológicos, como aparición de anticuerpos anti-insulina, anti-células pancreáticas, anti-GAD, esta fase preclínica de la Diabetes Mellitus tipo 1 precede varios años al comienzo de la Diabetes Mellitus clínica. Además se encuentra una diferencia notable en la microflora de diabéticos y de no diabéticos. (GILARTE C. PERRONE, M. 2005)

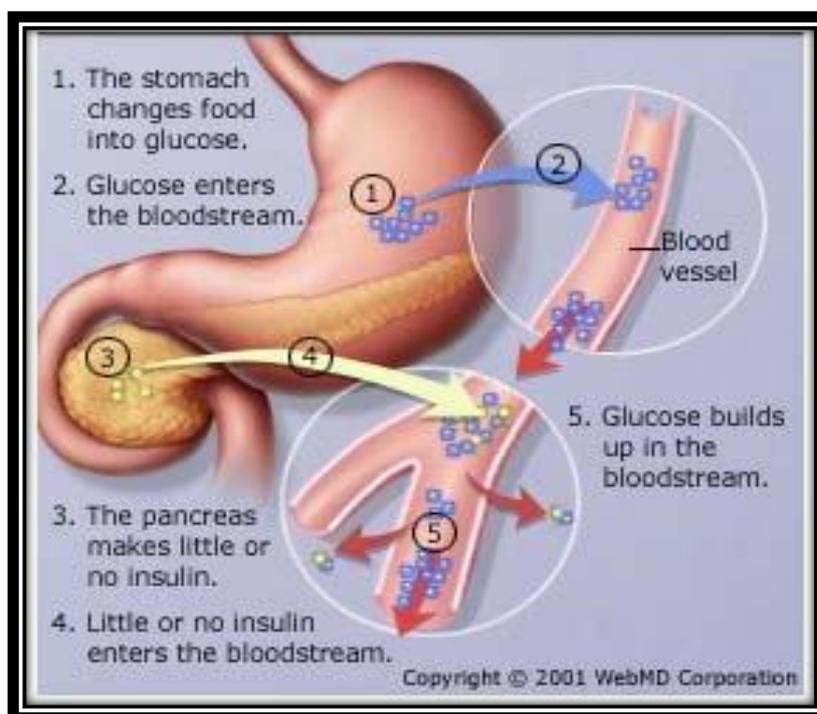
La diabetes tipo I también se había conocido con el nombre de diabetes juvenil, dado que aparece habitualmente antes de los 30 años. Este trastorno representa en torno al 10% de los casos de diabetes. (BALADA, MARQUÉZ, NADAL, REDOLAR, & SILVESTRE, Farmacología y Endocrinología del Comportamiento, 2012)

En la actualidad se ha establecido que la diabetes tipo I es una enfermedad autoinmune determinada genéticamente y que su sintomatología es la consecuencia de un proceso de destrucción de mecanismo autoinmune de las células beta productoras de insulina. Al ser destruida exclusivamente la célula beta pancreática, esta diabetes es el modelo de enfermedad autoinmune órgano específica. (ARRIBAS C. M.J, 2007).

Los datos existentes parecen mostrar una cierta predisposición genética, ya que parece existir una mayor susceptibilidad en sujetos caucásicos. La falta de insulina provoca que la glucosa presente en la sangre no pueda entrar en los tejidos y dé lugar a hiperglucemia. El exceso de glucosa en sangre será filtrada por el riñón, que será capaz de reabsorberla. (ARRIBAS C. M.J, 2007).

Este hecho provocará que la glucosa arrastre grandes cantidades de agua, dando lugar a uno de los síntomas característicos de la diabetes mellitus, la poliuria. La importante pérdida de líquidos provocará una deshidratación celular y la necesidad de ingerir grandes cantidades de agua, polidipsia. La hiperglucemia también provoca efectos en el sistema inmunitario favoreciendo la aparición de infecciones crónicas. (ARRIBAS C. M.J, 2007).

**FIGURA N° 2. 4 DIABETES TIPO I**



**Fuente:**<http://iescampostorozos.jefernet.com/periodico/sites/default/files/users/user154/diabetes-tipo1.jpg>

#### 2.2.12.4.1. Síntomas y signos

Los siguientes síntomas pueden ser los primeros signos de diabetes tipo 1 o pueden ocurrir cuando el azúcar en la sangre está alto:

- Intensa poliuria
- Polifagia pérdida de peso
- Fatiga

También inciden otros factores como: cambios vasculares, disfunción de polimorfos nucleares, síntesis de colágeno anormal y predisposición genética. (GILARTE C. PERRONE, M. 2005)

#### 2.2.12.4.2. Tratamiento

Debido a que la diabetes tipo 1 puede empezar rápidamente y los síntomas pueden ser graves, las personas que acaban de recibir el diagnóstico posiblemente necesiten permanecer en el hospital.

Si a usted le acaban de dar el diagnóstico de diabetes tipo 1, probablemente deba hacerse un chequeo médico cada semana hasta que tenga un buen control sobre su azúcar en la sangre. El médico revisará los resultados del monitoreo de su glucemia en el hogar y de las pruebas de orina. El médico también examinará su diario de comidas, refrigerios e inyecciones de insulina. Puede tomar unas semanas adecuar las dosis de insulina a su horario de comidas y actividades.

La insulina baja el nivel de azúcar en la sangre permitiendo que salga del torrente sanguíneo y entre en las células. Toda persona con diabetes tipo 1 debe tomar insulina diariamente. (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000305.htm>)

#### 2.2.12.5. Diabetes Mellitus Tipo II

La Diabetes Mellitus tipo II es una enfermedad que afecta la forma en que el cuerpo utiliza la glucosa (azúcar). La insulina ayuda a extraer el azúcar de la sangre para que pueda usarse en la producción de energía. Generalmente, cuando el nivel de azúcar aumenta, el páncreas produce más insulina. (FOSTER D. W. 1998).

La Diabetes Mellitus tipo II se desarrolla ya sea porque el cuerpo no puede producir suficiente insulina, o no la puede usar correctamente. Después de muchos años, su páncreas podría dejar de producir insulina. Los pacientes con Diabetes Mellitus tipo II conservan cierta capacidad de secreción de insulina endógena a pesar de lo cual presentan anomalías manifiestas de la homeostasia de la glucosa como hiperglucemia mantenida. A diferencia del tipo 1 los enfermos con Diabetes Mellitus tipo II son relativamente resistentes a desarrollar cetosis en condiciones basales debido precisamente a la conservación de la capacidad de secreción de insulina endógena. (FOSTER D. W. 1998).

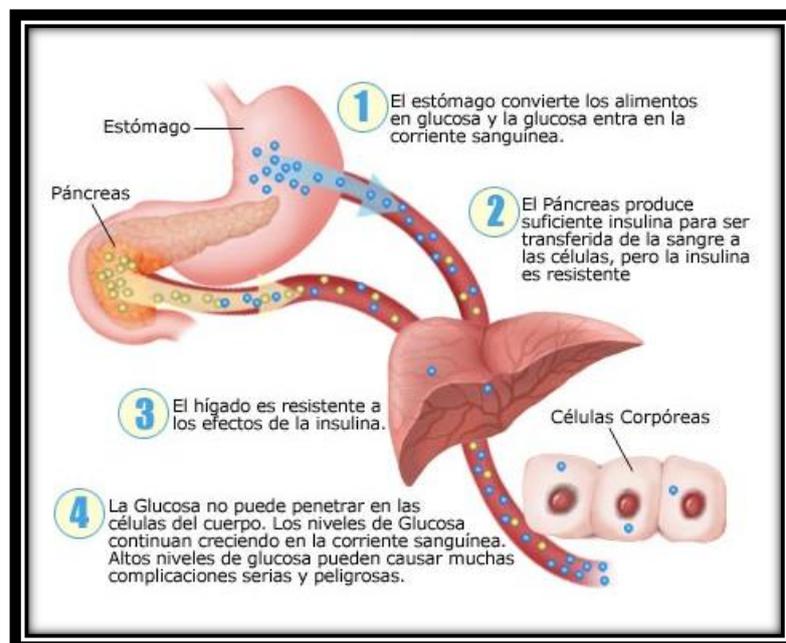
Se ha comprobado que existe una enorme influencia genética en la transmisión de la mayoría de los pacientes con Diabetes Mellitus tipo II. Este modo de transmisión no está claro. (FOSTER D. W. 1998).

No obstante y dada la relación evidente entre obesidad preexistente y desarrollo de Diabetes Mellitus tipo II, no cabe duda alguna de que los factores ambientales desempeñan un papel importante en la patogenia de la enfermedad. (GILARTE. C. PERRONE M. 2005).

En las últimas dos décadas, en relación con el aumento de obesidad, ha habido un incremento en la incidencia de diabetes mellitus tipo II tanto en adultos como en la infancia y la adolescencia. Para el desarrollo de diabetes mellitus tipo II no sólo es preciso la resistencia a la insulina sino que es necesario que falle la célula beta y disminuya la secreción de insulina. (FOSTER D. W. 1998).

La hiperinsulinemia es la anomalía metabólica más temprana observada seguida de un incremento de la producción hepática de glucosa que provoca hiperglucemia. (FOSTER D. W. 1998).

**FIGURA N° 2.5 DIABETES TIPO II**



**Fuente:**[http://www.cuidadosalud.com/sites/all/themes/cm\\_mfcontent/imagenes/content/cuidadosalud\\_0512\\_causas\\_de\\_diabetes.jpg](http://www.cuidadosalud.com/sites/all/themes/cm_mfcontent/imagenes/content/cuidadosalud_0512_causas_de_diabetes.jpg)

#### 2.2.12.5.1. Síntomas y signos

Muchos pacientes no presentan signos ni síntomas. Los síntomas pueden ser tan leves que a veces ni se notan. Algunas personas tienen síntomas pero no sospechan que tengan Diabetes Mellitus. El inicio de la enfermedad es brusco con intensa poliuria, polifagia, pérdida de peso y fatiga. (RANGEL F. E.E., MORALES DE CERDA G. 2007).

Los posibles signos y síntomas son:

- Aumento de la sed y aumento del apetito.

- Fatiga.
- Aumento en la frecuencia con que se orina, especialmente de noche.
- Pérdida de peso, visión borrosa.
- Heridas que no sanan.

Muchas personas no averiguan que padecen la enfermedad hasta que presentan complicaciones de la Diabetes Mellitus, como visión borrosa o problemas del corazón. (FOSTER D. W. 1998).

Es importante establecer pronto si una persona tiene Diabetes Mellitus porque el tratamiento puede prevenir el daño al cuerpo causado por la enfermedad. (FOSTER D. W. 1998).

#### 2.2.12.5.2. Reducción de riesgo de desarrollo diabetes mellitus tipo II

Usted puede hacer mucho para reducir las probabilidades de padecer Diabetes Mellitus. Hacer ejercicio con regularidad, reducir el consumo de grasas y calorías y bajar de peso puede ayudarle a reducir el riesgo de padecer Diabetes Mellitus tipo 2. (FOSTER D. W. 1998).

Reducir la presión arterial y los niveles de colesterol también ayuda a mantenerse sano. (FOSTER D. W. 1998).

#### 2.2.12.5.3. Tratamiento

Clásicamente se han considerado tres pilares fundamentales en el tratamiento de la Diabetes Mellitus. (RANGEL F. E.E., MORALES DE CERDA G. 2007).

- Dieta.
- Ejercicio físico
- Tratamiento farmacológico.
- Hoy en día se considera esencial un cuarto componente; educación diabetológica del paciente. (DUQUE D.E. R.J., RODRÍGUEZ C. A. 2001)

Los objetivos generales del tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo II son:

- Eliminar los síntomas mediante la normalización de los niveles de glucemia

- Prevenir las complicaciones metabólicas agudas
- Prevenir, rechazar o minimizar las complicaciones de la enfermedad
- Reducir la morbilidad y la mortalidad derivadas de la enfermedad macro-vascular.

#### 2.2.12.6. Diabetes gestacional

La diabetes gestacional es el tipo que se diagnostica por primera vez durante el embarazo, generalmente durante el segundo trimestre. Durante el embarazo, la placenta produce varias hormonas que se oponen al efecto de la insulina y producen un incremento en los niveles de glucosa. El efecto hormonal, aunado al incremento normal de peso durante el embarazo predispone a la diabetes. (MARQUEZ.G, 2007).

##### 2.2.12.6.1. Quienes tienen riesgo de padecer diabetes gestacional

Cualquier mujer embarazada está en riesgo de desarrollar diabetes gestacional, sin embargo hay mujeres que tienen más riesgo:

- Mujeres con sobrepeso y obesidad al inicio del embarazo.
- Antecedente de diabetes gestacional en otro embarazo o haber dado a luz a un bebé mayor de 4 kg.
- Historia familiar de diabetes tipo 2 (principalmente en hermanos o padres)
- Las mujeres mayores de 25 años, aunque el riesgo es aún mayor después de los 35.
- Diagnóstico previo de prediabetes.

Las mujeres con estos factores de riesgo tienen hasta el doble de probabilidad de desarrollar diabetes gestacional que otras mujeres embarazadas. Los tres primeros puntos de la lista son los más frecuentemente asociados a diabetes gestacional, pero si se agregan otros factores de riesgo aumenta la posibilidad de desarrollar diabetes gestacional. (MARQUEZ.G, 2007).

##### 2.2.12.6.2. Consecuencias de padecer diabetes gestacional

La diabetes gestacional se asocia a riesgos para la madre y para el bebé, el cual puede tener un crecimiento acelerado en el útero y pesar más de 4 kg al momento de nacer, lo que dificulta el parto y hace necesario realizar una cesárea en algunos casos. También pueden presentar bajas de glucosa después del nacimiento, dificultad respiratoria, aumenta el riesgo de partos prematuros y muertes fetales. En la madre la diabetes gestacional se asocia

a hipertensión del embarazo (o preeclampsia) y también existe el riesgo de que el la diabetes persista después del embarazo o se repita en los embarazos subsecuentes. (MARQUEZ.G, 2007).

#### 2.2.12.6.3. Problemas después del parto con la diabetes gestacional

La mayor parte de las veces la diabetes gestacional revierte después del parto. Se recomienda hacer nuevas pruebas de sangre entre las 6 y 12 semanas después del parto para determinar si los niveles de glucosa regresaron a sus niveles normales. Debido a que las mujeres que tuvieron diabetes gestacional tienen riesgo de desarrollar diabetes en otro momento de la vida, se recomienda que continúen con una dieta adecuada y una rutina de ejercicio, eviten subir de peso y revisen sus niveles de glucosa de manera rutinaria. Un tratamiento adecuado y oportuno mejora el pronóstico para la madre y el bebé. La participación de la paciente junto con el equipo médico es importante para lograr los objetivos. (MARQUEZ.G, 2007).

#### 2.2.12.7. Consecuencias de la diabetes

Con el tiempo, la diabetes puede dañar el corazón, los vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios. La diabetes aumenta el riesgo de cardiopatía y accidente vascular cerebral (ACV). El 50 % de los pacientes diabéticos, mueren de enfermedad cardiovascular (principalmente cardiopatía y ACV). (FOSTER D. W. 1998).

La neuropatía de los pies combinada con la reducción del flujo sanguíneo incrementa el riesgo de úlceras de los pies y, en última instancia, amputación. La retinopatía diabética es una causa importante de ceguera, y es la consecuencia del daño de los pequeños vasos sanguíneos de la retina que se va acumulando a lo largo del tiempo. Al cabo de 15 años con diabetes, aproximadamente un 2 % de los pacientes se quedan ciegos, y un 10 % sufren un deterioro grave de la visión. (FOSTER D. W. 1998).

La diabetes se encuentra entre las principales causas de insuficiencia renal. El 10 a 20 % de los pacientes con diabetes, mueren por esta causa. La neuropatía diabética se debe a lesión de los nervios a consecuencia de la diabetes, y puede llegar a afectar a un 50 % de los pacientes. Aunque puede ocasionar problemas muy diversos, los síntomas frecuentes consisten en hormigueo, dolor, entumecimiento o debilidad en los pies y las manos. En los

pacientes con diabetes el riesgo de muerte es al menos dos veces mayor que en las personas sin diabetes. (FOSTER D. W. 1998).

### 2.2.13. Inmunoensayos

#### 2.2.13.1. Antígeno

Un antígeno suele ser una molécula ajena o tóxica para el organismo (por ejemplo, una proteína derivada de una bacteria) que, una vez dentro del cuerpo, atrae y se une con alta afinidad a un anticuerpo específico. Cada anticuerpo es capaz de lidiar específicamente con un único antígeno gracias a la variabilidad que le otorga la región determinante de complementariedad del anticuerpo dentro de la fracción Fab de los mismos.

Para que un antígeno sea reconocido por un anticuerpo, estos interactúan por complementariedad espacial. La zona donde el antígeno se une al anticuerpo recibe el nombre de epítopo o determinante antigénico, mientras que el área correspondiente de la molécula del anticuerpo es el parátopo. (Sicora, 2001)

#### 2.2.13.2. Anticuerpo

Son glicoproteínas del tipo gamma globulina, pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales que sintetizan nuestro sistema inmunitario para defendernos de bacterias, virus, hongos... y otros parásitos que infectan nuestro organismo.

Los anticuerpos son generalmente formados por una células de la sangre que se llaman linfocitos B.

Todos los anticuerpos se generan reconociendo alguna proteína específica de estos microorganismos que nos invaden. La proteína que reconoce el anticuerpo se denomina antígeno. (Sicora, 2001)

#### 2.2.13.3. Reacción Antígeno- Anticuerpo (Ag-Ac)

La reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) es una de las piedras angulares en la respuesta inmunitaria del cuerpo humano. El concepto se refiere a la unión específica de un anticuerpo con un antígeno para inhibir o demorar su toxicidad.

El acoplamiento estructural entre las macromoléculas se realiza gracias a varias fuerzas débiles que disminuyen con la distancia, como los puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van Der Waals, las interacciones electrostáticas y las hidrofóbicas. El reconocimiento Ag-Ac es una reacción de complementariedad, por lo que se efectúa a través de múltiples enlaces no covalentes entre una parte del antígeno y los aminoácidos del sitio de unión del anticuerpo. La reacción se caracteriza por su especificidad, rapidez, espontaneidad y reversibilidad. ([https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n\\_ant%C3%ADgeno-anticuerpo](https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_ant%C3%ADgeno-anticuerpo))

#### ❖ Especificidad

Capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno que lo estimuló a través del epítipo o determinante antigénico mediante uniones intermoleculares débiles. La unión dada por la especificidad es muy precisa y permite distinguir entre grupos químicos con diferencias mínimas a pesar de su similitud; además, permite la detención de un sólo antígeno en cuestión. Por ejemplo permite distinguir entre albúmina de un organismo a otro a pesar de que la variabilidad en los parátomos sea mínima. ([https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n\\_ant%C3%ADgeno-anticuerpo](https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_ant%C3%ADgeno-anticuerpo))

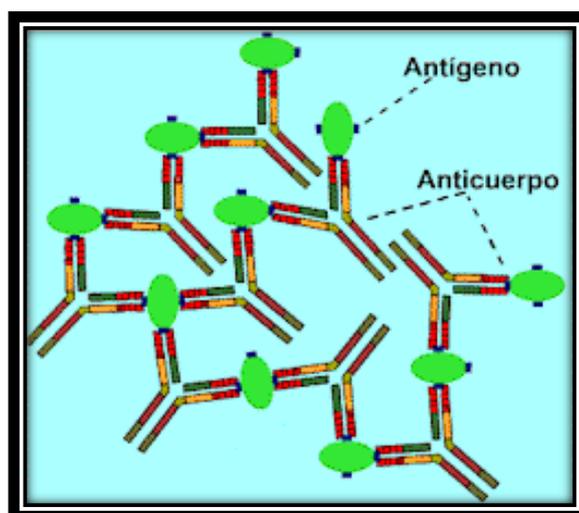
#### ❖ Rapidez

La velocidad con que ocurre la primera etapa de la reacción Ag-Ac es del orden de milésimas de segundo, y está limitada únicamente por la difusión. La segunda etapa, que es más larga, incluye todas las manifestaciones que se presentan como consecuencia de la interacción, tales como precipitación, aglutinación, neutralización, etc. ([https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n\\_ant%C3%ADgeno-anticuerpo](https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_ant%C3%ADgeno-anticuerpo))

#### ❖ Reversibilidad

Dado que la reacción se debe a fuerzas no covalentes, es reversible y, en consecuencia, se ve afectada por factores como la temperatura, la proporción de Ag-Ac, el pH y la fuerza iónica. ([https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n\\_ant%C3%ADgeno-anticuerpo](https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_ant%C3%ADgeno-anticuerpo))

## FIGURA N° 2. 6 REACCIÓN ANTÍGENO- ANTICUERPO



**Fuente:** <http://robertcabre.com/2013/12/19/introduccion-a-la-intolerancia-alimentaria/antigeno-anticuerpo>

### 2.2.13.4. Anticuerpo monoclonal

Un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula y una célula plasmática tumoral.

Los anticuerpos monoclonales, son anticuerpos idénticos porque son producidos por un solo tipo de célula del sistema inmune, es decir, todos los clones proceden de una sola célula madre. Es posible producir anticuerpos monoclonales que se unan específicamente con cualquier molécula con carácter antigénico.

#### 2.2.13.4.1. Anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados.

Los anticuerpos monoclonales de ratón o murinos, pese a ser perfectamente válidos para todos los usos terapéuticos, no son útiles para su empleo en seres humanos, especialmente en terapias que requieran tratamientos prolongados, ya que el sistema inmune los identifica como cuerpos extraños y reacciona para destruirlos, por lo que su eficacia terapéutica se ve claramente disminuida. Además pueden presentar posibles efectos secundarios como nefrotoxicidad, reacciones anafilácticas, etc. Por ello se debería obtener anticuerpos monoclonales humanos.

Se han desarrollado diferentes técnicas para ofrecer soluciones a la inicial imposibilidad de obtener anticuerpos monoclonales enteramente humanos, entre las que destacan la transformación de linfocitos B humanos en cultivo mediante el virus de Epstein-Barr, la utilización de ratones con inmunodeficiencia severa combinada, el uso de ratones transgénicos, o técnicas de ADN recombinante. Todas estas técnicas han presentado distintos inconvenientes que han imposibilitado el desarrollo final de los anticuerpos monoclonales humanos.

Sin embargo, se ha obtenido una segunda generación de anticuerpos monoclonales, basada en la humanización de los anticuerpos monoclonales de ratón mediante ingeniería genética, evitando así el rechazo del sistema inmune al ser introducidos en el organismo. Son los llamados anticuerpos quiméricos. Un anticuerpo quimérico es creado de tal manera que incorpora parte animal y parte humana. La parte animal o hipervariable (un 30%) es indispensable para que el anticuerpo reconozca la sustancia extraña (antígeno) y la parte humana (un 70%) es responsable de que el sistema inmunitario pueda contribuir a añadir efectividad a su acción. De este modo es posible modificar los anticuerpos monoclonales, casi de manera infinita para dotarlos de propiedades efectoras y de reconocimiento diferentes a las originales y minimizar la posibilidad de generar respuesta inmune frente al propio anticuerpo terapéutico.

Un anticuerpo monoclonal humanizado significa que contiene un 90% de material humano, lo que reduce la inmunogenicidad de los anticuerpos, es decir, el rechazo del sistema inmunitario. La humanización es una técnica que se basa en la estructura terciaria del sitio de combinación con el antígeno, el paratopo, donde existen unas regiones responsables de la unión al antígeno mientras que otras zonas sólo sirven de soporte estructural al paratopo. Por lo tanto las regiones estructurales se obtienen de un anticuerpo humano mientras que las regiones responsables de la unión al antígeno proceden del anticuerpo del ratón. (Sicora, 2001)

#### 2.2.13.4.2. Anticuerpos policlonales.

Son anticuerpos derivados de diferentes líneas de células B, los linfocitos encargados de la respuesta ante elementos ajenos (antígenos) mediante anticuerpos.

Los anticuerpos policlonales son una mezcla de inmunoglobulina, secretados en contra de un antígeno específico, cada una reconociendo diferentes epítopes.

Habitualmente se obtienen de lo que se denomina un antisuero. Obtenido de la inyección reiterada de un antígeno en un animal, con el fin de generar una respuesta inmune. De este animal se toma una muestra de sangre y de esta muestra es obtenido el suero que finalmente es purificado para obtener la variedad de anticuerpos policlonales de interés. (Sicora, 2001)

#### 2.2.14. Tipos de inmunoensayos

Existen varios tipos de inmunoensayos para la determinación del péptido C, los cuales son:

- Enzimoimmunoanálisis (EIA), Técnica de ELISA
- Radioinmunoensayo (RIA)
- Fluoroimmunoanálisis (FIA)
- Electroquimioluminiscencia (ECLIA)

##### 2.2.14.1. Enzimoimmunoanálisis (EIA)

Se basan habitualmente en la captura del antígeno por anticuerpos específicos unidos a una fase sólida, en general el pocillo de una microplaca o una pequeña esfera de plástico. El antígeno viral presente en la muestra clínica se combina con el anticuerpo fijado a la fase sólida y el antígeno viral se detecta mediante la adición de otro anticuerpo específico conjugado a una enzima. La enzima conjugada suele ser peroxidasa o fosfatasa alcalina. El sustrato para esas enzimas varía. En la reacción con la peroxidasa el sustrato es un peróxido capaz de oxidar un compuesto químico incoloro que en su forma oxidada tiene un color característico.

En el caso de la fosfatasa la defosforilización es la responsable directa de la aparición del color. Por esta técnica se puede procesar gran número de muestras en forma rápida y automatizada, no requiriendo de un observador experimentado para leer los resultados, ya que estos se leen por medio de espectrofotómetros especialmente diseñados, siendo entonces una técnica más objetiva. (Sicora, 2001)

##### 2.2.14.2. Enzimoimmunoanálisis indirecto

Los EIA indirectos se han aplicado de forma amplia en los últimos años al diagnóstico de anticuerpos virales.

Tiene las ventajas de ser un método versátil, relativamente económico, sensible y de lectura objetiva (instrumental).

La metodología es la siguiente: Los antígenos virales se inmovilizan sobre una fase sólida y se agregan los sueros en estudio; se incuban, se lavan y se revela la reacción Ag-Ac por el agregado de una inmunoglobulina antiespecie conjugada con una enzima, seguida por el substrato apropiado para esta. Los resultados se pueden leer con un espectrofotómetro y en algunos casos de forma visual. (Sicora, 2001)

#### 2.2.14.3. Técnica de elisa

La técnica ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ‘ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas’) es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costos del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. (GARCÍA. SEGURA, J. M. Y COL. 2002).

La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra. Se usa en muchos laboratorios para determinar si un anticuerpo particular está presente en la muestra de sangre de un paciente. Aunque el procedimiento es rutinario y sencillo, involucra a un gran número de variables, tales como selección de reactivo, temperatura, medición de volumen y tiempo, que si no se ajustan correctamente, puede afectar los pasos sucesivos y el resultado de la prueba. (GARCÍA. SEGURA, J. M. Y COL. 2002).

La interacción antígeno-anticuerpo en el laboratorio puede ser utilizada para determinar si un paciente tiene una infección o una enfermedad autoinmune. Pero como prueba diagnóstica, posee diversas limitaciones que conviene conocer:

- En primer lugar, un resultado positivo que confirma la presencia de anticuerpos no significa necesariamente que el paciente esté enfermo. El cuerpo de una persona que ha estado enferma y que ya se ha recuperado puede seguir produciendo anticuerpos. Esto originaría un falso positivo.

- En segundo lugar, hay personas que producen una baja cantidad de anticuerpos, por lo que estos pueden pasar desapercibidos y no ser medidos, dando lugar a un falso negativo.

Sería el caso, por ejemplo, de personas que padezcan una inmunodeficiencia, o que se encuentren en el periodo ventana de la infección en el momento de realizar la prueba, o que estén infectadas por una cepa extraña.

- En tercer lugar, pueden aparecer falsos positivos cuando se da inespecificidad entre antígeno-anticuerpo.

En estos casos de diagnóstico de enfermedad, es recomendable la eliminación (mediante centrifugación) de células de la sangre que puedan interferir con el ensayo y puedan ocasionar un resultado falso positivo, careciendo aquel de especificidad.

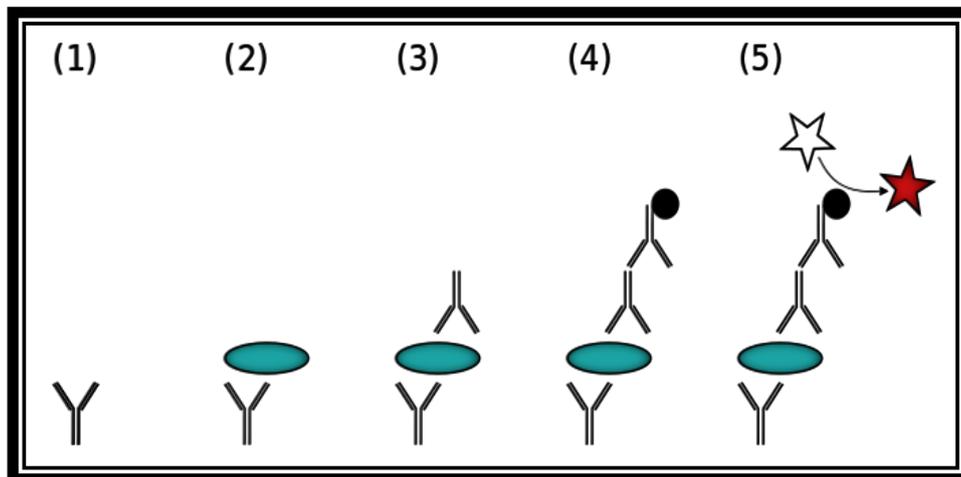
También, debemos tener en cuenta que cuando se trata de diagnosticar una enfermedad que posee un valor predictivo positivo bajo en una determinada población -es decir, que esa enfermedad tiene muy baja incidencia en dicha población-, es necesario volver a confirmar el resultado positivo mediante otro método de diagnóstico independiente. (GARCÍA. SEGURA, J. M. Y COL. 2002).

Normalmente, se lleva a cabo un western blot donde se detecta la presencia de varios anticuerpos, simultáneamente, frente a la misma infección en una muestra. El resultado del western se considera positivo cuando aparecen al menos 5 bandas, que indica que 5 anticuerpos diferentes están presentes en el sujeto frente a esa infección. Es entonces cuando se diagnostica como positivo a dicho paciente. (GARCÍA. SEGURA, J. M. Y COL. 2002).

Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto y simple en su realización, mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre. Además se han propuesto y desarrollado diferentes métodos de amplificación de la señal (luminiscentes, cascadas enzimáticas, etc.) que han permitido elevar la sensibilidad de algunos ELISA a la obtenida en el RIA (radioinmunoensayo) hormonal. (GARCÍA. SEGURA, J. M. Y COL. 2002).

Este método ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisaba la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc (GARCÍA. SEGURA, J. M. Y COL. 2002)

**FIGURA N° 2.7** TÉCNICA ELISA



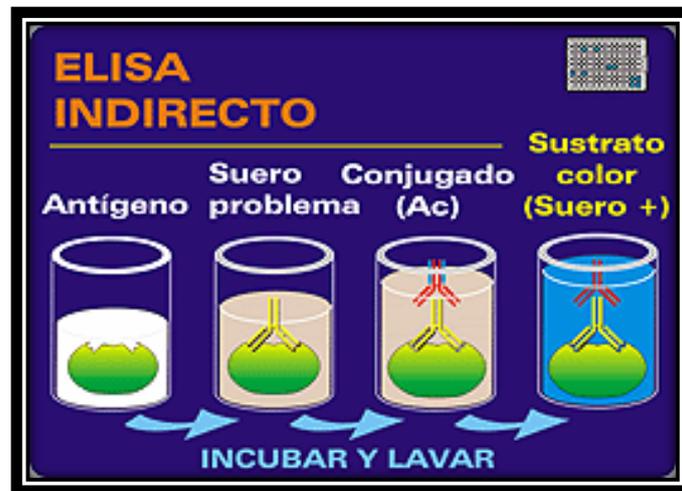
Fuente: <http://es.wikipedia.org/wiki/ELISA#/media/File:ELISA-sandwich.svg>

#### 2.2.14.3.1. Elisa directo

(Ensayo ELISA simple de dos capas). Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo que las analizadas (sangre, orina), pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado). En este método se fija el antígeno al soporte, se lava para eliminar los no fijados, luego se adicionan los anticuerpos marcados con la enzima para que reaccionen con el antígeno y que solubilizado el complejo, se lava para eliminar anticuerpos que no reaccionaron y se agrega un sustrato específico para la enzima, al final se observa la coloración. (GONZÁLEZ de B, 2010).

2.2.14.3.2. Elisa indirecto

FIGURA N° 2. 8 ELISA INDIRECTO



Fuente: <https://www.google.com.ec/search?q=elisa+indirecto+fundamento&biw>

Las placas ELISA se preparan de la misma forma a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. Es el ensayo más popular, como lo es la inmunofluorescencia indirecta, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permiten cuantificar una gran variedad de antígenos; por eso es un método más polivalente y barato, aunque se pierda algo de precisión por tener un eslabón más con respecto al método directo. La dilución de la solución que contiene el anticuerpo primario —por ejemplo, suero sanguíneo— es un factor muy importante a tener en cuenta para evitar la aparición de falsos negativos, ya que si la muestra está muy diluida, no saldrá positiva si la titulación de anticuerpos es muy baja. (Es decir, aunque los anticuerpos están presentes, la prueba no da positivo porque la concentración de anticuerpos específicos contra el antígeno que está pegado en el fondo del pocillo no es suficiente como para dar una señal detectable.). (GONZÁLEZ de B, 2010).

2.2.14.3.3. Elisa sándwich

FIGURA N° 2.9 ELISA TIPO SANDWICH



Fuente: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca051.htm>

En Elisa sándwich puede realizarse en un solo paso o en dos. En el sistema de un solo paso, se incuban juntos el espécimen con el segundo anticuerpo marcado con la enzima, mientras que el de dos, en el primer paso se une la cantidad total de la sustancia en el espécimen al anticuerpo marcado con la enzima que se une a un segundo, se añade el segundo anticuerpo marcado con la enzima que se une a un segundo determinante antigénico en la sustancia a analizar unida al primer anticuerpo. En ambos casos, se forma un sándwich, y la actividad enzimática unida en el complejo antígeno-anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de la sustancia que se cuantifica.

Los ensayos sándwich doble antígeno, son usados para la detección de anticuerpos y son muy útiles para la evaluación de la respuesta inmune inducida por vacunas; en estos ensayos, al igual que en los indirectos, los antígenos capturan los anticuerpos, pero en esta ocasión en lugar de un conjugado anti-inmunoglobulina-enzima, usamos antígeno-enzima, de esta forma se alcanza la máxima sensibilidad y detectabilidad al no ser necesario diluir las muestras; sin embargo, detectamos todas las clases de inmunoglobulinas, lo que en ocasiones no es conveniente.

En general, los ensayos sándwich son más apropiados para la automatización de los sistemas ELISA, ya que puede disminuirse un paso de reacción añadiendo simultáneamente muestras y conjugado, aunque hay que prever las posibles interferencias

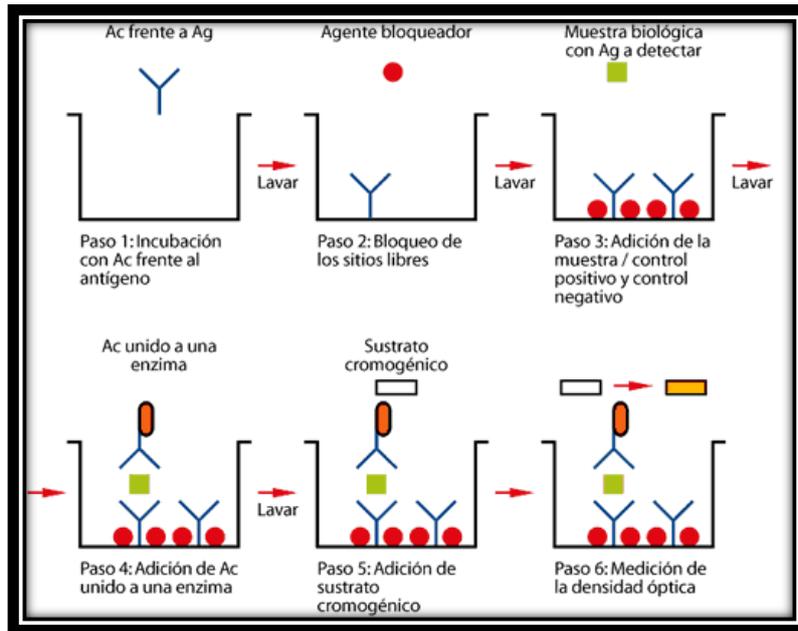
del conjugado a elevadas concentraciones de antígenos o anticuerpos en la muestra. (<http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/investigaciones/Tecnicas%20inmunoenzimaticas%20para%20ensayos%20clnicos%20de%20vacunas%20y%20estudios%20inmunoepidemiologicos.pdf>).

#### 2.2.14.3.4. Elisa competitivo

Elisa competitivo, los anticuerpos contra la sustancia a analizar ligados a la fase sólida pueden unir tanto el antígeno de la muestra como el marcado con la enzima del reactivo. Como la concentración del anticuerpo anclado es pequeña, el antígeno del espécimen puede competir por los lugares de unión con el antígeno marcado del reactivo. Cuanto menor sea la concentración de la sustancia a analizar en el espécimen, mayor será la cantidad del antígeno marcado con la enzima que se une. Tras la incubación, las sustancias no unidas se separan mediante un lavado. La actividad enzimática es inversamente proporcional a la concentración de la sustancia que hay que analizar en el espécimen.

Fijación de anticuerpos específicos al soporte anticuerpos, adición en concentración conocida de una mezcla de antígenos del anticuerpo utilizado en el paso anterior, marcados con una enzima y antígenos desconocidos (objeto de estudio). Al mismo tiempo, añadir únicamente antígenos del anticuerpo usado en el paso anterior, marcados con una enzima, lavar. Agregar un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea. Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado de ambas pruebas y comparar los resultados. Si las lecturas de ambas pruebas son iguales, el antígeno a estudio no tiene nada que ver con los anticuerpos empleados en el soporte. Si hay diferencia en las lecturas de ambos pocillos, el antígeno objeto de estudio, está relacionado con el anticuerpo empleado para tapizar el soporte y la diferencia de absorbancia o densidad óptica, es proporcional a la concentración del antígeno problema.

**FIGURA N° 2. 10 ELISA COMPETITIVO**



**Fuente:** <http://www.bioacademia.com.mx/miembros/tecnologia/0003.html>

#### 2.2.14.3.5. Fases de un ensayo elisa

Las cuatro fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

1. **Conjugación del anticuerpo o del antígeno con una enzima** (peroxidasa, fosfatasa alcalina...). El anticuerpo conjugado a la enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sandwich, etc. El antígeno marcado se emplea en ensayos de competición de antígeno. Dicha unión anticuerpo-enzima o antígeno-enzima ha de producirse durante un determinado período de tiempo en aras de producir una solución coloreada y que pueda ser valorada visualmente o cuantificada por medio de un espectrofotómetro (normalmente a una longitud de onda de 414 nm). Si no transcurre el tiempo adecuado para que se dé la reacción, no se evidenciará ningún color, interpretándose este resultado como un falso negativo y disminuyendo la sensibilidad de la técnica. (<http://es.wikipedia.org/wiki/ELISA>).
2. **Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos.** La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas. Así, el procedimiento de recubrimiento de los pocillos debe realizarse cuidadosamente. Si se usa mucho antígeno, se pueden obtener falsos positivos. Por el contrario, si se usa poco antígeno, el exceso dará lugar a una reacción falsa negativa. (<http://es.wikipedia.org/wiki/ELISA>).

3. **Formación de una o más capas de inmunocomplejos.** En el caso del antígeno unido a la placa, se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti-primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa, se incuba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno. En esta etapa es muy importante controlar los factores tiempo y temperatura de incubación para evitar la aparición de falsos negativos. En el caso del tiempo, si es inferior a 15 minutos, no ocurrirá la interacción antígeno-anticuerpo y el color no será evidente al final del ensayo, dando un falso negativo. Por su parte, si la temperatura de incubación es muy baja, la formación del complejo antígeno-anticuerpo tampoco se completará en el tiempo establecido, mientras que si es muy alta, las proteínas (antígeno y anticuerpo) se desnaturalizan y, por tanto, disminuyen su capacidad para interactuar, dando igualmente falsos negativos. (<http://es.wikipedia.org/wiki/ELISA>).
4. **Revelado de la reacción enzimática.** Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos, se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica mediante espectrofotometría. (<http://es.wikipedia.org/wiki/ELISA>).

#### 2.2.15. Radioinmunoensayo (RIA)

El Radioinmunoensayo (o abreviado RIA del inglés Radioimmunoassay) es un tipo de inmunoensayo o método radioinmunométrico que se basa en la formación específica de los complejos Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) lo que le dota de una gran especificidad unido a la sensibilidad de los métodos radiológicos. La técnica ha sido prácticamente reemplazada por el método ELISA el cual mide la unión Ag-Ac mediante colorimetrías en lugar de radiometrías. (GARCÍA-SEGURA, J. M. Y COL. 2002).

El fundamento es muy sencillo:

- Se mezcla una cantidad constante de antígeno marcado radioactivamente y una cantidad constante de un anticuerpo para ese antígeno

- Se produce la reacción entre antígeno (Ag) y anticuerpo (Ac)
- Se separa la fracción de antígeno que se ha unido de la que permanece libre (hay varias formas de hacerlo. En la figura inferior se utiliza un 2º anticuerpo dirigido contra el primero)
- Se determina la radioactividad
- Si la muestra contiene además antígeno frío (no marcado), éste competirá con el marcado para unirse al anticuerpo, y se observará un descenso en la medida de la radioactividad.
- Este descenso es proporcional a la concentración de antígeno frío en la muestra.  
(<http://www.ehu.eus/biomoleculas/isotopos/ria.htm>)

#### 2.2.16. Fluoroimmunoanálisis (FIA)

La Fluoroimmunoanálisis (FIA) se utiliza para el marcaje los compuestos fluorescentes. Las características principales que deben tener estos compuestos para su uso en los FIA son:

- Poseer una intensidad de fluorescencia elevada.
- Que sea posible diferenciar su fluorescencia de la de fondo que producen las muestras biológicas.
- Que su unión al antígeno o al anticuerpo no afecte de forma adversa sus propiedades.

Los compuestos fluorescentes más utilizados como marcadores en este tipo de inmunoanálisis son los derivados de la fluoresceína, la rodamina y la umbeliferona. (GONZÁLEZ DE BUITRAGO, 2010).

Esta técnica sigue un protocolo básicamente igual al descrito para EIA, con la diferencia de utilizar como marcador una molécula fluorescente o un sustrato que por la acción de un enzima se transforma en una molécula fluorescente.

La lectura de fluorescencia es utilizada para el cálculo de los resultados en la misma forma que en RIA. (<http://www4.ujaen.es/~esiles/ENDOCRTEma6.pdf>).

**NOTA:** Las moléculas fluorescentes son aquellas que al ser excitadas por una radiación con una longitud de onda determinada, inmediatamente emiten una radiación con una

longitud de onda mayor que es medida por un espectrofluorímetro. (Fluorescencia es distinto que fosforescencia). (<http://www4.ujaen.es/~esiles/ENDOCRTema6.pdf>).

#### 2.2.17. Electroquimioluminiscencia (ECLIA)

Es un proceso muy sensible en el que se genera especies reactivas en la superficie de un electrodo a partir de precursores estables (Rutenio), volviendo luego al estado basal mediante una reacción quimioluminiscente. El marcador activado es el rutenio (II)-tres (bipiridil) N-hidroxi succinimida ester.

El proceso de ECLIA consta de una inmunoreacción convencional (competitiva o sandwich) donde el Ag o Ac biotinilado es incubado con la muestra y el marcador de rutenio unido a Ag o Ac. El inmunocomplejo formado es capturado por partículas de poliestireno magnéticas, recubiertas con estreptavidina que fijan las moléculas biotiniladas.

Luego de una incubación, las partículas son arrastradas a una celda de flujo.

Se separa la fracción unida de la libre mediante un magneto ubicado debajo del electrodo. El inmunocomplemento queda retenido en la superficie del electrodo

Posteriormente a un lavado, se genera la señal de ECL al aplicar un voltaje al electrodo. El rutenio pasa a un estado excitado, inestable y luego decae a su estado basal emitiendo un fotón a 620 nm. Una sola molécula de rutenio puede generar muchos fotones por reciclado del proceso de excitación, lográndose la amplificación de la señal con límites bajos de detección. (Sicora, 2001)

#### 2.2.18. Técnica en la determinación del péptido C – ACCU BIND

La diabetes es una de las causas que conlleva a incapacidad y muerte en USA. Esta afecta a un estimado de 16 millones de americanos, una tercera parte de ellos no conoce que tiene la enfermedad. Las causas de la diabetes no son precisamente conocidas, pero factores ambientales y genéticos juegan un papel importante. (INC, 200).

La enfermedad se debe a la deficiencia del cuerpo para producir insulina. La forma más común es el tipo 1, en donde la habilidad del cuerpo para producir insulina es destruida; en

el tipo 2, el cuerpo es resistente a la insulina aunque algunas cantidades pueden ser producidas. (INC, 200).

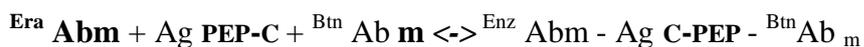
Determinaciones in -Vitro de niveles de Insulina y péptido-C ayudan en el diagnóstico diferencial de enfermedades del hígado, acromegalia, síndrome de Cushing, intolerancia a la glucosa, insulinoma, falla renal, ingestión accidental de drogas orales hipoglucémicas. Tanto la Insulina como el péptido-C son producidos por acción enzimática de la proinsulina. (INC, 200).

La proinsulina es almacenada en los gránulos secretores de las células p pancreáticas y está dividido entre 31 aminoácidos conectados por péptidos (péptido -C MW3600) e insulina (MW 6000). El péptido-C no tiene actividad biológica pero parece ser necesario para mantener la integridad estructural de la insulina. El péptido-C y la insulina son secretados a la circulación en concentraciones equimolar, niveles de péptido-C son 5 -10 veces más altos que los de la insulina debido a la larga vida media del péptido-C. El hígado no extrae el péptido-C sin embargo es removido de la circulación por los riñones. Los niveles de péptido-C en orina correlaciona bien con los niveles del mismo en suero. La determinación de péptido-c ayuda en él diagnóstico diferencial de diabetes insulino-dependiente de no insulino dependiente. (INC, 200).

#### 2.2.18.1. Principio- ensayo inmunoenzimométrico (TIPO 3)

Los reactivos esenciales requeridos para un ensayo Inmunoenzimométrico incluyen un anticuerpo de alta afinidad y especificidad, con diferentes epitopes de reconocimiento y antígeno nativo. En este proceso la inmovilización toma lugar en el pozo de la microplaca que está recubierta con estreptavidina la cual se une con la biotina del anticuerpo monoclonal anti - Péptido C. El anticuerpo monoclonal biotinizado y el antígeno nativo presente en el suero reaccionan dando un complejo antígeno-anticuerpo. (INC, 200).

#### **Ka**



#### **K-a**

${}^{B,n} Ab_m = Ab_{monoclonal} Biotinizado$

Ag PEP-C = Antígeno Nativo (cantidad variable)

$E_{nj}$  Abm = Ab monoclonal-Enzima marcado (Cantidad constante)

$E_{ni}$  Abm- Agc-PEP-  $B_{tn}$  Ab m = Complejo Sandwich Ab-Ag **Ka** = Tasa Constante de Asociación **K-a** = Tasa Constante de Disociación

Simultáneamente el complejo es depositado en los pozos con una alta reacción de afinidad entre los anticuerpos con estreptavidina y biotina:

$E_{IE}$  Abm-AgpEP-c- $B_{n}$  Abm - Estreptavidina cw => Complejo inmovilizado

Estreptavidina cw=Estreptavidina inmovilizada en el pozo Complejo inmovilizado = Complejo sandwich unido a la fase sólida.

Después de completar la incubación, los pozos son lavados para eliminar residuos. La actividad de la enzima presente sobre la superficie de los pozos es cuantificada por la reacción con el sustrato que produce color. La fracción de anticuerpo unido es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo. (INC, 200).

#### ❖ MATERIALES PROVISTOS POR EL KIT

##### **Calibradores péptido-C - 2.0 ml/vial ■ Icons A-F.**

Seis (6) viales de referencia: 0 (A), 0.2 (B), 1.0 (C), 2.0 (D), 5.0 (E), y 10.0 (F) ng/ml. Reconstituir cada vial con 2 ml de agua destilada o desionizada. Los calibradores reconstituidos son estables 7 días de 2°-8°C. Para periodos más largos alicuotar en crioviales y almacenar a -20°C. No descongelar más de una vez. Tiene preservantes.

**NOTA:** El estándar basado en suero humano, fue calibrado usando una preparación de referencia, los cuales fueron ensayados contra WHO 1t (IRP # 84/510).

##### **Reactivo enzima péptido-C -13 ml/vial –Icon.**

Un (1) vial con anticuerpo monoclonal marcado de ratón IgG con biotina en buffer, con color, y con preservante. Almacenar de 2° - 8° C.

### **Placa estreptavidina -96 pozos – Icon.**

Una microplaca con 96 pozos recubiertos con estreptavidina y empacados en una bolsa de aluminio con desecantes. Almacenar de 2° - 8° C.

Solución de lavado concentrada - 20 ml – Icon.

Un (1) vial que contiene buffer salino. Tiene preservantes. Almacenar de 2° - 30° C. (Ver la sección de preparación de reactivos)

### **SUBSTRATO A - 7.0 ML/VIAL - ICON S\***

Un (1) frasco con tetrametilbencidina (TMB) en buffer. Almacenar de 2- 8° C. (Ver la sección de preparación de reactivos)

### **SUBSTRATO B - 7.0 ML/VIAL - ICON S<sup>6</sup> -**

Un (1) frasco con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en buffer. Almacenar de 2- 8° C. (Ver la sección de preparación de reactivos)

### **SOLUCIÓN STOP - 8 ML/VIAL - ICON**

Una (1) botella con ácido fuerte (HCL 1N). Almacenar de 2-30° C

### **INSTRUCCIONES DEL PRODUCTO**

**Nota 1:** No usar reactivos después de la fecha de vencimiento.

**NOTA 2:** Los reactivos después de destapados duran 60 días almacenados de 2- 8° C.

**NOTA 3:** Los reactivos anteriores son para kit de 96 pozos.

### **❖ MATERIALES NO PROVISTOS EN EL KIT**

1. Pipetas automáticas de capacidad variable, 25 y 50 ul con una precisión mayor del 1.5%,
2. Dispensador de volumen variable entre 0.100ml y 0.300 ml, con una precisión mayor de 1.5%,

3. Lavador de microelisa o botella de apretar (opcional),
4. Lector Microelisa con longitud de onda de 450 y 620 nm,
5. Papel absorbente,
6. Tapas de microelisa, para pasos de incubación,
7. Bomba de vacío (opcional) pasos de lavado,
8. Cronómetro,
9. Material de control de calidad.

#### ❖ RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La muestra debe ser sangre, extraer el suero teniendo en cuenta las precauciones en la recolección de muestras por venopunción. Para una exacta comparación están establecidos valores normales, en muestras tomadas a primera hora de la mañana.

La sangre debe ser colectada en tubo tapa-roja sin aditivos o anticoagulantes. La muestra se coagula y luego se centrifuga, para separar el suero de las células. Las muestras pueden ser refrigeradas de 2 - 8 °C por un periodo máximo de 5 días. Si las muestras no pueden ser analizadas en este tiempo se pueden almacenar a - 20 °C hasta por 30 días. Evitar repetidas descongelaciones. Cuando procese por duplicado, necesita mínimo 0.100 ml de muestra. (INC, 2000).

#### ❖ PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

##### 1. **BUFFER DE LAVADO.**

Diluir el contenido del frasco en 1000 ml de agua destilada o desionizada. Almacenar a temperatura ambiente 20 - 27 °C.

##### 2. **SOLUCIÓN SUBSTRATO de TRABAJO.**

Almacenar de 2 - 8 °C. Preparar solo lo necesario mezclando cantidades iguales de reactivo A y reactivo B. Descartar el reactivo sobrante.

#### ❖ PROCEDIMIENTO

Antes de comenzar la determinación, todos los reactivos, controles y sueros de referencia deben ser llevados a temperatura ambiente (20 - 27 °C).

1. Sacar el número de pozos a usar, cada suero de referencia, controles y muestras deben ser probados por duplicado; devuelva los micropozos no usados a la bolsa de aluminio, selle y guarde de 2 - 8 °C
2. Dispensar 50ul de estándares, muestras y controles en los pozos.
3. Dispensar 100 ul Reactivo enzima péptido C. Es muy importante dispensar todos los reactivos cerca al fondo del pozo.
4. Mezclar la microplaca de 20 a 30 segundos y cubrir.
5. Incubar a temperatura ambiente (18°- 30°C) por 120 minutos.
6. Decantar y lavar con buffer de lavado preparado, adicionando 350 ul de buffer por 3 veces.
7. Un lavador manual o automático puede ser usado.
8. Eliminar el exceso de agua sobre papel absorbente.
9. Dispensar 100ul de la solución substrato de trabajo.
10. NO agitar LA MICROPLACA después de ADICIONAR el TMB.
11. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos en oscuridad.
12. Adicionar 50 ul de solución stop, mezclar.
13. Leer en absorbancia de 450 nm con filtro diferencial de 630 nm. Los resultados deben ser leídos en el transcurso de treinta (30) minutos.

## ❖ RESULTADOS

Una curva dosis respuesta es usada para averiguar las concentraciones de las muestras, el récord de absorbancia se obtiene de la impresión del lector de micro Elisa. Graficar las absorbancias para cada suero de referencia contra la correspondiente concentración del analito en un papel de gráfica lineal. Para determinar la concentración de una muestra desconocida, localizar el promedio de las absorbancias del desconocido sobre el eje vertical de la gráfica, encontrar el punto de Intercepción sobre la curva, y leer la concentración desde el eje horizontal de la gráfica (los duplicados deben ser promediados). (INC, 2000).

**TABLA N° 2.1 RESULTADOS DE LA MUESTRA CONTROL**

Muestra	Pozo	ABS	Media ABS	Ng/ml
<b>Cal A</b>	<b>A 1</b>	<b>0.022</b>	<b>0.022</b>	<b>0</b>
	<b>B 1</b>	<b>0.023</b>		
<b>Cal B</b>	<b>C 1</b>	<b>0.097</b>	<b>0.103</b>	<b>0.2</b>
	<b>D 1</b>	<b>0.107</b>		
<b>Cal C</b>	<b>E 1</b>	<b>0.421</b>	<b>0.429</b>	<b>1</b>
	<b>F 1</b>	<b>0.439</b>		
<b>Cal D</b>	<b>G 1</b>	<b>0.889</b>	<b>0.901</b>	<b>2</b>
	<b>H 1</b>	<b>0.910</b>		
<b>Cal E</b>	<b>A 2</b>	<b>1.976</b>	<b>1.971</b>	<b>5</b>
	<b>B 2</b>	<b>1.966</b>		
<b>Cal F</b>	<b>C 2</b>	<b>2.717</b>	<b>2.643</b>	<b>10</b>
	<b>D 2</b>	<b>2.570</b>		
<b>Control 1</b>	<b>E 2</b>	<b>0.429</b>	<b>0.433</b>	<b>1.03</b>
	<b>F 2</b>	<b>0.437</b>		
<b>Control 2</b>	<b>G 2</b>	<b>1.861</b>	<b>1.887</b>	<b>4.64</b>
	<b>H 2</b>	<b>1.913</b>		
<b>Paciente</b>	<b>A 3</b>	<b>0.388</b>	<b>0.405</b>	<b>0.82</b>
	<b>B 3</b>	<b>0.421</b>		

Fuente: INC, 2000

### Parámetros Q.C

Para validar los ensayos se debe cumplir con los siguientes criterios:

- La absorbancia (OD) del calibrador F deber ser > 1.3
  - La absorbancia (OD) del calibrador A deber ser < 0.05
  - Cuatro de seis controles de calidad deben estar dentro de los rangos establecidos.
- ❖ LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO EN EL DESARROLLO DEL ENSAYO
1. El tiempo de reacción en los pozos es importante para obtener resultados reproducibles.
  2. La pipeteada de las muestras no debe pasar de 10 minutos.

3. La dicción de la solución sustrato inicia una reacción cinética la cual es terminada por la adición de la solución stop.
4. La lectura es verticalmente. No toque el botón de los pozos.
5. Si se hace más de una microplaca es recomendable realizar curva en la otra microplaca.
6. Si hay falla en el lavado, la reproducibilidad de los resultados va a ser muy pobre.
7. Usar componentes del mismo lote. No mezclar lotes.
8. Muestras contaminadas microbiológicamente, lipémicas y hemolizadas no deben ser usadas.

❖ VALORES DE RANGOS ESPERADOS

Los valores son consistentemente altos en plasma que en suero; se prefiere usar suero. Comparando con valores en individuos no obesos, no diabéticos, los niveles de péptido-C son altos en sujetos obesos no diabéticos y bajos en atletas. (INC, 2000).

Cada laboratorio debe obtener sus propios rangos de población normal y anormal. Estos rangos son dependientes de la población, localidad, laboratorio, técnica y especificidad del método. Basado en datos clínicos los siguientes datos pueden ser usados como guía. (INC, 2000).

**Valores de referencia (ng/ml)**

**Adulto (normal):** 0.7- 1.9 ng/ml

❖ CARACTERÍSTICAS DE DESARROLLO

La precisión intra e inter ensayos fue determinada sobre tres diferentes niveles de sueros control. Se determinó media, D.S, CV.

**TABLA N° 2. 2 PRECISIÓN INTRA- ENSAYOS (ng/ml)**

Muestra	AI X	DS	CV
Pool 1	20 0.82	0.07	8.53%
Pool 2	20 3.16	0.19	6.0%
Pool 3	20 8.11	0.52	6.4%

**Fuente:** INC, 2000

**TABLA N° 2.3 PRECISIÓN INTER- ENSAYO (ng/ml)**

<b>Muestra</b>	<b>Precisión Inter ensayos (ng/ml)</b>		
	<b>N X</b>	<b>DS</b>	<b>CV</b>
Pool1	20 0.79	0.09	11.2%
Pool 2	20 3.31	0.22	6.61%
Pool 3	20 8.99	0.85	9.45%

**Fuente:** INC, 2000

La medición fue en 10 experimentos por duplicado en diez días.

### **Exactitud.**

Péptido-C Accubind ELISA fue comparado con test radio inmunoanálisis. Muestras biológicas normales, altas y bajas (rangos 0.2 ng/ml - 11.8 ng/ml) fueron usadas. En total fueron 124 muestras. Según los datos la media está muy cercana entre el método de referencia y el Accubind ELISA.

**TABLA N° 2.4 EXACTITUD**

<b>Método</b>	<b>Media</b>	<b>Análisis - Regresión</b>	<b>Coefficiente - Correlación</b>
<b>Este método</b>	1.068	$y = 0.2079 + 0,8036(x)$	0.962
<b>Referencia</b>	1.066		

**Fuente:** INC, 2000

### ➤ **Sensibilidad.**

La sensibilidad (El límite de detección) se determinó por la variabilidad del suero calibrador de 0 ng/ml y usando 2 DS (confianza del 95) calculando la dosis mínima la cual fue de 0.025 ng/ml. (INC, 2000).

### ➤ **Especificidad.**

La reacción cruzada de este método fue evaluada adicionando sustancias que interfieren en una matriz de suero en varias concentraciones. (INC, 2000).

La reacción cruzada fue calculada derivando el porcentaje entre la dosis de sustancia de interferencia y la dosis de péptido-C necesaria para producir la misma cantidad de absorbancia. (INC, 2000).

**TABLA N° 2.5 ESPECIFICIDAD**

<b>Sustancia</b>	<b>Reacción cruzada</b>	<b>Conc.</b>
<b>Péptido-C</b>	1.0000	-
<b>Pro insulina</b>	0.120	100 ng/ml
<b>Insulina</b>	No detectable	1.0 nU/ml
<b>Glucagón</b>	No detectable	150 ng/ml

**Fuente:** INC, 2000

#### ❖ CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe tener controles de calidad con rangos altos, normales y bajos, para el monitoreo del ensayo. Estos controles deben ser procesados como muestras desconocidas y determinar los valores en cada test. Los métodos estadísticos deben ser empleados para averiguar la tendencia. (INC, 2000).

Una significativa desviación puede indicar cambios inadvertidos en las condiciones del experimento o degradación de los reactivos del kit. Reactivos nuevos deben ser usados para determinar las razones de la variación. (INC, 2000).

#### ❖ LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo sea mantenido en forma constante para resultados reproducibles
- El pipeteo de las muestras no se extenderá más de 10 min para evitar derivar el ensayo
- Si más de una placa es usada, se recomienda repetir la curva de respuesta a dosis.
- La adición de la solución sustrato inicia una reacción cinética, la cual es terminada por la adición de la solución de parada. Por lo tanto, los sustratos y la solución de

detención serán adicionados en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación durante la reacción.

- Los lectores de placa medirán verticalmente. No tocar el fondo de los pozos.
- La falla en remover la solución adherente adecuadamente en los pasos de aspiración o lavado por decantación puede resultar en una pobre replicación y resultados falsos.
- Las muestras altamente contaminadas, hemolizadas o altamente lipemicas no serán usadas.
- Las muestras de pacientes con concentraciones de Péptido C de más de 10ng/ml pueden diluirse con el calibrador cero y reensayadas. Multiplicar x el valor obtenido por el factor de dilución para obtener el valor corregido.

Usar los componentes del mismo lote no mezclar los reactivos de diferentes lotes.

#### ❖ PRECAUCIONES

Todos los productos que contienen suero humano fueron encontrados no reactivos para antígeno de superficie de la hepatitis B, anticuerpos HIV 1& 2 y HVC con reactivos aprobados por la FDA. No se conoce que los test puedan asegurar que los agentes infecciosos estén ausentes, todos los productos con suero humano deben ser manejados como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedades. Las buenas prácticas de laboratorio para la manipulación de sangre pueden ser encontradas en el Centro de control de enfermedades/ Instituto Nacional de salud, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y Biomédicos 2nd edición. 1988, publicación HHS No. (CDC) 88 - 8395. (INC, 2000).

### 2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

**Acinos pancreáticos:** Glándulas pancreáticas encargadas de secretar enzimas hacia el tubo digestivo.

**Péptido C:** Es una cadena de proteínas, que resultan del proceso de fabricación de insulina de las células beta. Durante este proceso, se divide otra molécula conocida como proinsulina y da como resultado: insulina y Péptido-C.

**Ciclo de Krebs:** Es una ruta metabólica, es decir, una sucesión de reacciones químicas, que forma parte de la respiración celular en todas las células aeróbicas. En células eucariotas se realiza en la mitocondria. En las procariotas, el ciclo de Krebs se realiza en el citoplasma, específicamente en el citosol.

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo.

**Radioinmunoensayo (RIA):** Es un tipo de inmunoensayo o método radioinmunométrico que se basa en la formación específica de los complejos Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) lo que le dota de una gran especificidad unido a la sensibilidad de los métodos radiológicos.

**Diabetes:** La diabetes mellitus es una enfermedad compleja, multicausal, caracterizada por una insuficiencia absoluta o relativa de insulina que conduce, como hecho principal de las repercusiones metabólicas, a hiperglucemia.

**Colagenasa:** La colagenasa es una enzima, más específicamente una metaloproteinasa de matriz que rompe los enlaces peptídicos de los colágenos que pueden ser tipo (I, II, III, IV, V) y que contiene zinc.

**Fibroblastos:** El fibroblasto es un tipo de célula residente del tejido conectivo propiamente dicho, ya que nace y muere allí. Sintetiza fibras y mantiene la matriz extracelular del tejido de muchos animales.

**Glucocorticoides:** Son hormonas de la familia de los Corticosteroides que participan en la regulación del metabolismo de carbohidratos favoreciendo la gluconeogénesis y la glucogenogénesis hepática con actividad inmunosupresora. Su acción reguladora se extiende también al metabolismo intermedio de grasas y proteínas.

**Hiperglucemia:** cantidad excesiva de glucosa en la sangre. Es el hallazgo básico en todos los tipos de diabetes mellitus, cuando no está controlada o en sus inicios. El término opuesto es hipoglucemia.

**Hiperinsulinemia:** El término hiperinsulinemia hace referencia a unos niveles de insulina en la sangre más elevados de lo normal, aunque no se considera una enfermedad como tal.

**Hipokalemia:** Es un trastorno del metabolismo producido por un descenso del potasio en sangre. El potasio es necesario para las células en general y fundamentalmente para las células musculares y nerviosas.

**Insulinomas:** Es un tumor del páncreas endocrino. Se origina en las células beta y es más frecuente en cuerpo y cola. Cursan con la tríada de Whipple.

**Islotes de Langerhans:** Son acúmulos de células que se encargan de producir hormonas como la insulina y el glucagón, con función netamente endocrina. También secretan inmunoglobulinas.

**Nefropatía:** La nefropatía se refiere al daño, enfermedad o patología del riñón. Otro término más antiguo para ella es nefrosis. Una causa de la nefropatía es el uso de analgésicos a largo plazo.

**Neuropatía:** La neuropatía es una enfermedad del sistema nervioso periférico. Un alto porcentaje de personas con diabetes desarrollará daños en su sistema nervioso en algún momento de su vida.

**Retinopatía diabética:** Es una complicación ocular de la diabetes que está causada por el deterioro de los vasos sanguíneos que irrigan la retina. El daño de los vasos sanguíneos de la retina puede tener como resultado que estos sufran una fuga de fluido o sangre.

## 2.4. HIPÓTESIS

**H<sub>i</sub>:** (Hipótesis de la investigación): Se puede utilizar el método de Elisa para la determinación de los niveles de Péptido C, en pacientes diabéticos atendidos en el hospital José María Velasco Ibarra.

## 2.5. VARIABLES

### 2.5.1. Variable independiente

- Método ELISA

### 2.5.2. Variable dependiente

- Determinación de los valores de péptido C

2.5.3. Operalización de variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	CATEGORÍAS	INDICADOR	TÉCNICAS E INST.
<b>Independiente</b>  <b>Método de ELISA</b>	Es una técnica en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable	Elisa Directo  Elisa Indirecto  Elisa Sándwich  Elisa Competitivo	Identificación y cuantificación de los niveles de péptido C	Técnica: Método cuantitativo de ELISA.  Instrumento: Equipo de ELISA
<b>Dependiente</b>  <b>Péptido C</b>	Es una cadena de proteínas, que resultan del proceso de fabricación de insulina de las células beta	Proteína de péptido C	Determinar los niveles bajos , elevados o normales del péptido C	Técnica: Método cuantitativo de ELISA.  Instrumento: Equipo de ELISA

**Fuente:** Investigación propia.

**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. MÉTODOS

En la presente investigación, se realizaron los siguientes métodos:

**Método deductivo:** Este método nos ayudara a determinar las causas y consecuencias que va a producir, a través del método cuantitativo como el método ELISA.

**Método inductivo:** Este método nos ayudara a determinar las causas y consecuencias que originan en la determinación del péptido C.

**Método Analítico:** Se distinguen los elementos de un fenómeno y se procede a revisar ordenadamente cada uno de ellos por separado. Consiste en la extracción de las partes de un todo, con el objeto de estudiarlas y examinarlas por separado, para ver, por ejemplo las relaciones entre las mismas.

#### 3.2. TIPO DE ESTUDIO

**Estudios Descriptivos:** Describen los hechos como son observados durante el trabajo de investigación.

#### 3.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación fue del tipo transversal, ya que tuvo un principio y un final, la cual se realizó en una muestra de 50 pacientes con pronóstico de diabetes mellitus atendidos en el hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad del Tena. Los valores de péptido C fueron determinados en el suero de los pacientes, mediante el método de ELISA.

**Bibliográfico:** Porque para llevar a cabo la investigación, se han buscado y recopilado datos de libros y archivos formato “Pdf” de internet, referentes al tema a investigarse.

### 3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

**De campo:** Realizaremos nuestro estudio en el Laboratorio clínico del Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad del Tena, en donde son atendidos los pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus y/u otras patologías asociadas a los niveles anormales de insulina.

**De Laboratorio:** El estudio en la determinación del péptido C mediante la utilización del método ELISA se realizara dentro del laboratorio del Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad del Tena, se construye en la variable de estudio la misma será observada tal como se da indicara en el protocolo, y será sujeta a manipulación por parte del investigador, siempre y cuando cuente con el debido conocimiento de las respectivas normas de bioseguridad en el laboratorio.

### 3.5. POBLACIÓN Y MUESTRA

#### 3.5.1. Población

La presente investigación, tiene un total de 50 pacientes con pronóstico de diabetes mellitus y otras patologías asociadas a niveles anormales de insulina, que son atendidos en el Hospital José María Velasco de la ciudad de Ibarra.

#### 3.5.2. Muestra

Se trabajó con el universo de la población, 50 muestras de sangre (suero) de pacientes entre hombres y mujeres, por existir poca población.

### 3.6. TÉCNICA EN INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

**TÉCNICA:** Método cuantitativo de ELISA

**INSTRUMENTO:** Equipo de ELISA

Esta investigación, consideró a pacientes con pronósticos de diabetes mellitus que acudían al control diario del diabetes en el Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad del Tena, a los cuales se les aplicó una prueba de la ELISA (es una técnica cuantitativa) en sangre para determinar el péptido C.

**Estadística:** Esta técnica es muy útil para la comparación matemática de datos y en esta investigación la utilizamos para contrastar datos de personas con niveles anormales de Péptido C en relación con los estándares normales.

**Guía de Registro:** Elaborada para asentar los resultados en el análisis de Péptido C y para su cuantificación.

**Procesamiento de las muestras:** Las muestras fueron recolectadas y analizadas en el laboratorio, teniendo en cuenta los cuidados de bioseguridad respectivos por parte del personal. Los tubos fueron identificados con el código respectivo que se trabaja en el laboratorio; cada paciente fue registrado con todos sus datos.

### 3.7. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las técnicas que se utilizaron son tabulaciones representadas en cuadros estadísticos, gráficos, para su posterior análisis e interpretación y se interpreta los resultados mediante la observación de la detección de una enzima y un antígeno dando como resultado una concentración.

## CAPÍTULO IV

### 4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

**TABLA N° 4.1 PACIENTES QUE SE EXAMINARÓN PARA DETERMINACIÓN DE PÉPTIDO C**

Código	Edad	Genero	Resultados ng/ml
1	50	M	1,80
2	39	M	4,20
3	51	M	0,80
4	65	F	0,20
5	80	M	3,20
6	54	M	1,01
7	39	F	2,00
8	43	M	1,71
9	52	F	3,40
10	40	F	0,71
11	44	F	2,60
12	48	M	3,02
13	73	F	3,00
14	34	F	2,00
15	54	F	2,00
16	80	M	0,81
17	60	F	1,49
18	82	F	0,80
19	39	M	0,28
20	39	M	0,50
21	30	M	0,25
22	67	M	0,44
23	68	F	3,13
24	47	M	3,01
25	56	F	0,82
26	34	M	0,91
27	51	M	2,32
28	47	M	0,52
29	50	F	1,71
30	39	F	2,00
31	56	M	1,49
32	30	F	1,70
33	74	M	0,80
34	53	F	1,86
35	73	M	2,45
36	51	F	3,34
37	40	F	1,49
38	46	F	0,99
39	65	M	0,71
40	68	F	1,71
41	52	M	0,58
42	67	F	2,68
43	34	M	3,20
44	38	M	2,71
45	80	M	0,60
46	35	F	1,80
47	44	F	2,30
48	39	M	3,05
49	65	M	2,02
50	38	F	2,00

**Fuente:** Hospital José María Velasco Ibarra

**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.

**Análisis e interpretación:** De los pacientes que fueron examinados, se procedió a realizar un cálculo para saber en qué género hubo un resultado alto de péptido C, dándonos como resultado que en el género masculino hubo 10 personas mayor a los 2.02ng/dl mientras que el género femenino 12 personas sobrepasaron los 3.40 ng/dl.

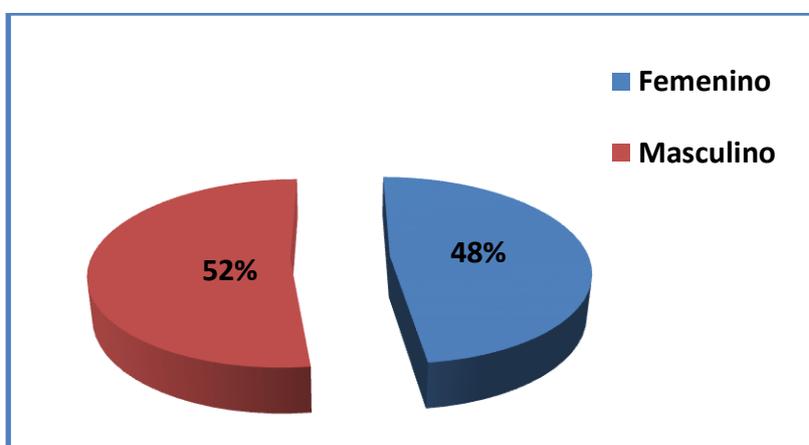
**TABLA N° 4.2** PACIENTES SEGÚN EL GÉNERO

GÉNERO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Femenino	24	48 %
Masculino	26	52 %
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>	<b>100 %</b>

**Fuente:** Hospital José María Velasco Ibarra

**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.

**GRÁFICO N° 4.2** POBLACIÓN SEGÚN EL GÉNERO



**Fuente:** Tabla N° 2

**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.

**Análisis e interpretación:** La población incluida en la investigación, muestra porcentajes muy similares es de decir según el género pacientes masculinos 26 que equivale al 52% mientras que 24 pacientes femeninos que equivale al 48%. Esto demuestra que la Diabetes mellitus, es una enfermedad común para ambos géneros.

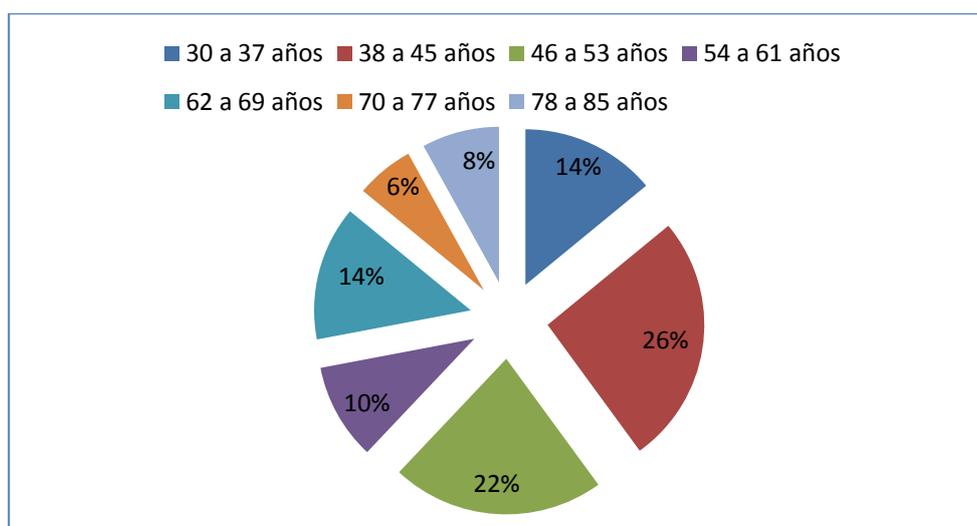
**TABLA N° 4.3 POBLACIÓN SEGÚN GRUPO ETARIO**

GRUPO ETARIO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
30 a 37 años	7	14%
38 a 45 años	13	26%
46 a 53 años	11	22%
54 a 61 años	5	10%
62 a 69 años	7	14%
70 a 77 años	3	6%
78 a 85 años	4	8%
Total	<b>50</b>	<b>100%</b>

**Fuente:** Hospital José María Velasco Ibarra

**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.

**GRÁFICO N° 4.3 POBLACIÓN SEGÚN GRUPO ETARIO**



**Fuente:** tabla N° 3

**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.

**Análisis e interpretación:** La población involucrada en la investigación demuestra que la Diabetes mellitus afecta a cualquier grupo etario, y según los resultados de laboratorio, fue el grupo etario de 38 a 45 años, con el 26 % el más afectado. De todas maneras, la investigación pretende solamente demostrar la importancia en la determinación de Péptido C, para el control del paciente Diabético.

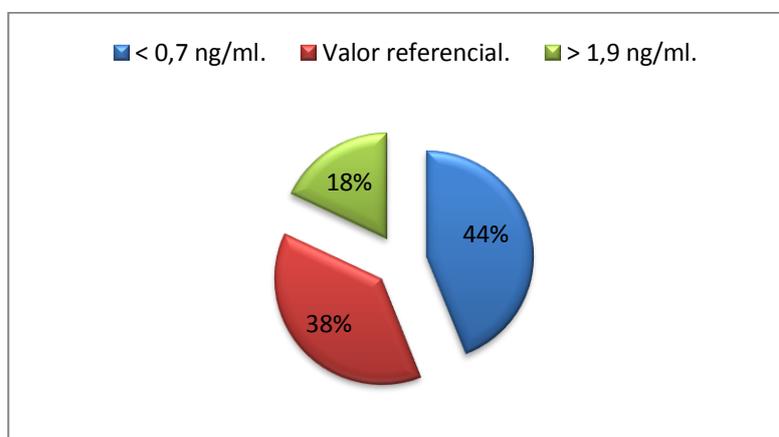
**TABLA N° 4.4 VALORES DE PÉPTIDO C EN LA POBLACIÓN**

Valores de Péptido C	Frecuencia	Porcentaje
< 0,7 ng/ml.	22	44 %
Valor referencial.	19	38 %
> 1,9 ng/ml.	9	18 %
Total	50	100 %

**Fuente:** Hospital José María Velasco Ibarra

**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.

**GRÁFICO N° 4.4 VALORES DE PÉPTIDO C EN LA POBLACIÓN**



**Fuente:** tabla N° 4

**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.

**Análisis e interpretación:** Se puede confirmar el diagnóstico positivo de los pacientes con Diabetes mellitus es función de los valores de referencia utilizados en la técnica empleada en la investigación (Determinación cuantitativa de péptido C en suero humano por ensayo inmunoenzimométrico). Los valores determinados, demuestran que existen 22 pacientes (44%), con baja producción de péptido C, 19 pacientes (38%) con valores normales de péptido C y, 18 pacientes (9%), que presentan aumento de péptido C.

#### 4.1. COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS

**H<sub>i</sub>:** El uso del método de Elisa nos ayudara en la determinación de los niveles de Péptido C, en pacientes diabéticos atendidos en el hospital José María Velasco Ibarra ya que es una técnica sensible y confiable para realizar este tipo de estudio.

**H<sub>o</sub>:** El uso del método de Elisa NO nos ayudara en la determinación de los niveles de Péptido C, en pacientes diabéticos atendidos en el hospital José María Velasco Ibarra ya que NO es una técnica sensible y confiable para realizar este tipo de estudio.

#### Formula Estadística

$$V < 0.7 \text{ ng/ml} + \text{VN} + V > 1.9 \text{ ng/dl} = \text{VT}$$

**TABLA N° 4.1 EFICACIA DE LA PRUEBA DE PÉPTIDO C**

Valores de Péptido C	Frecuencia.	Porcentaje.
Eficacia	31	62 %
Valor referencial	19	38 %
Total	50	100 %

**Fuente:** Hospital José María Velasco Ibarra

**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.

**Análisis e interpretación:** Se puede confirmar el diagnóstico positivo de la técnica empleada en la investigación (Determinación cuantitativa de péptido C en suero humano por ensayo inmunoenzimométrico), ya que los valores determinados, demuestran que existe un 62% de eficacia, en pacientes que fueron atendidos en el Hospital José María Velasco Ibarra en el periodo Febrero-Julio 2015.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

- Al concluir este trabajo de investigación se comprobó que el método Elisa dio resultados confiables demostrando su validez en la determinación de los niveles de Péptido C.
- Se analizaron los resultados de laboratorio en función de los valores de referencia llegando a la conclusión que hubo una validez del 62%
- Esta prueba es de vital importancia para la dosificación de insulina parenteral a pacientes diabéticos ya que la concentración de Péptido C es directamente proporcional al de insulina.
- Este test es de ayuda importante para el control y tratamiento en pacientes diabéticos tipo I y II

#### 5.2. RECOMENDACIONES

- Se debe tomar en cuenta bibliografías actualizadas y medios tecnológicos para conocer sobre la importancia de la formación y función del péptido C, así como la formación de la insulina y del páncreas en el organismo humano.
- Se recomienda la determinación de Péptido C, como técnica esencial para el correcto diagnóstico y tratamiento de la Diabetes mellitus.
- Se recomienda la utilización de otros métodos más sensibles como es la Electroquimioluminiscencia (ECLIA) como técnica de confirmación ya que es una prueba de cuarta generación.
- Se deben seguir buenas prácticas de laboratorio con todos los estándares nacionales aplicables para asegurar el cumplimiento de la prueba.

## BIBLIOGRAFÍA

ÁLVAREZ RODRÍGUEZ BERTHA ADRIANA y colb. Bioquímica: Metabolismo de carbohidratos. Academia de Bioquímica. Pags: 64-70.

BENYON S., ROACH J. O`NEALE. Lo esencial en metabolismo y nutrición. Editorial Harcourt Brace. Madrid, España. Pags: 89-91.

BONNADONNA RC, DEL PRATO S, RATHEISER K. Roles of glucose transport and glucose phosphorylation in muscle insulin resístanse of NIDDM. Diabetes, 45:915-25. (1996).

CAMPBELL MARY K., FARRELL SHAW O. Bioquímica, 4a Edición. Editorial Thomson International. México D.F., 2004. Pags. 497-501.

CARL BURTIS AND EDWARD ASHWOOD. "Tietz Textbook of Clinical Chemistry". United states of America, third edition, 1999.

DE FRONZO RA. (1997)Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. Diabetes Review, 1997; 5:177-269.

DONALD YOUNG AND RICHARD FRIEDMAN. "Effects of disease on clinical laboratory test". AACC, third edition, 1997.

DONALD YOUNG. "Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Test". AACC, second edition, 1997.

GARCÍA-SEGURA, J. M. y col. «1.17 Métodos Radioinmunométricos». Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica. Madrid: Síntesis. 84-7738-429-0, (2002).

JACOBS, DEMOTT, GRADY, HORVAT, HUESTIS, Kasten Laboratory Test Handbook. United States of America, 4th edition 1996.

LOTHAR THOMAS. "Clinical Labratory Diagnostics. Use and assessment of clinical laboartory results". Germany. Fisrt Edition, 1998.

MATHEWS, VAN HOLDE, ADHERN. Bioquímica, 3ª edición. Editorial Pearson Addison Wesley. Madrid, España, 2002, Pag. 628-639

MAYORAL LUIS G, M.D., M.S , Fisiología Digestiva: Páncreas Exocrino. Universidad del Valle; 1998. (1998).

MURRAY ROBERT K., MAYES PETER A., GRANNER DARYL K., RODWELL VICTOR W. Bioquímica de Harper, 14ª edición. Editorial Manual Moderno, México D.F., 2001, pags 233 – 244

NORBERT W. TIETZ. “Clinical Guide to Laboratory Test”. United States of America, third edition, 1995.

RANGEL FERNÁNDEZ E.E., MORALES DE CERDA G. Diabetes Mellitus Tipo 2 y Enfermedad Periodontal. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Salud Pública y Nutrición, (2007).

#### SITIOS WEB

- <http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclo-krebs.shtml>
- <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000305.htm>
- <http://www.monografias.com/trabajos5/retropros/retropros.shtml>
- (<http://www.anatomia.tripod.com/pancreas.htm>)
- <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000305.htm>
- [http://www.cuidadosalud.com/sites/all/themes/cm\\_mfcontent/images/content/cuidadosalud\\_0512\\_causas\\_de\\_diabetes.jpg](http://www.cuidadosalud.com/sites/all/themes/cm_mfcontent/images/content/cuidadosalud_0512_causas_de_diabetes.jpg)
- <http://es.wikipedia.org/wiki/ELISA>
- <http://www.ehu.es/biomoleculas/isotopos/ria.htm>
- <http://www4.ujaen.es/~esiles/ENDOCRTEma6.pdf>
- <http://www.webconsultas.com/pruebas-medicas/elisa-13695>
- [https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n\\_ant%C3%ADgeno-anticuerpo](https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_ant%C3%ADgeno-anticuerpo)

## ANEXOS

**Fotografía N° 1: equipo utilizado en la investigación.**



**Fuente:** Hospital José María Velasco Ibarra  
**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.

**Fotografía N° 2: Equipo de laboratorio.**



**Fuente:** Hospital José María Velasco Ibarra  
**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.

**Fotografía N° 3: Equipo de laboratorio.**



**Fuente:** Hospital José María Velasco Ibarra  
**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.

**Fotografía N° 4: Preparación de las muestras.**



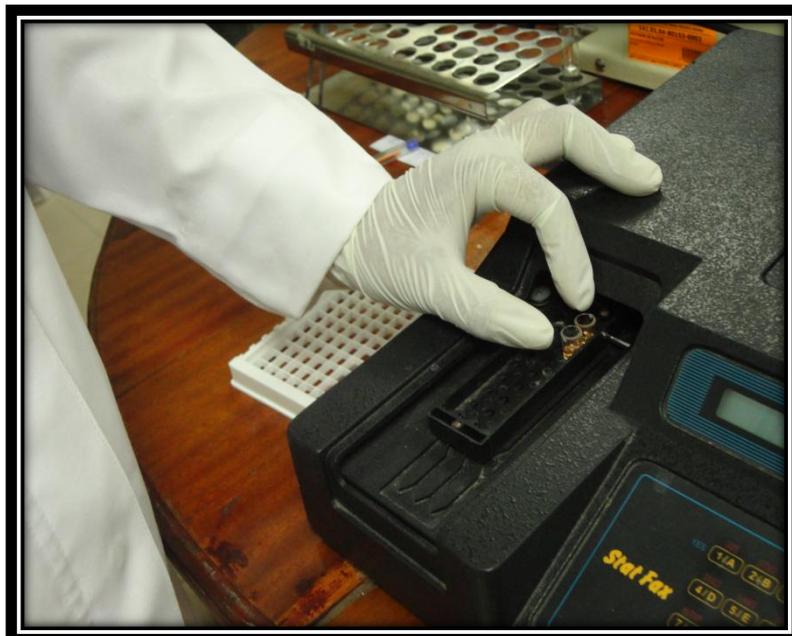
**Fuente:** Hospital José María Velasco Ibarra  
**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.

**Fotografía N° 5: Preparación de las muestras.**



**Fuente:** Hospital José María Velasco Ibarra  
**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.

**Fotografía N° 6: Lectura en el equipo.**



**Fuente:** Hospital José María Velasco Ibarra  
**Elaborado por:** Patricia M. Velásquez V.