



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**ANÁLISIS DE VITAMINA D EN MUESTRAS  
BIOLÓGICAS MEDIANTE TÉCNICAS ANALÍTICAS  
QUIMIOLUMINISCENTES**

Autor: María Jesús Rodríguez Almansa

D.N.I.: 02673914A

Tutor: María Antonia Martín Carmona

# ÍNDICE

1. RESUMEN .....	3
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....	4
2.1 Significación y origen de la vitamina D .....	4
2.2 Metabolismo de la vitamina D .....	4
2.3 Técnicas para el análisis de vitamina D .....	5
2.4 Quimioluminiscencia .....	6
2.5 Tipos de reacciones .....	9
2.6 Tipos de reactivos utilizados .....	10
2.7 Instrumentación: Luminómetro .....	11
3. OBJETIVOS .....	13
4. METODOLOGÍA .....	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
6. CONCLUSIONES .....	17
7. BIBLIOGRAFÍA .....	18
8. ABREVIATURA .....	20

## 1. RESUMEN

Las formas activas de la vitamina D son compuestos de importancia en la práctica clínica por su significación biológica, cuyo estudio se ha incrementado en los últimos años. La vitamina D desempeña funciones de regulación del metabolismo del calcio y fósforo. También es considerada un factor preventivo de enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer y enfermedades autoinmunes. Debido al posible papel de la vitamina D en estas patologías se han buscado métodos de determinación de los niveles de vitamina D en plasma, que sean exactos y eficaces.

El método analítico escogido para esta revisión bibliográfica es el de la quimioluminiscencia, el cual se basa en la generación de especies electrónicamente excitadas en el transcurso de diferentes reacciones químicas, las cuales son generalmente oxidaciones. Las especies excitadas originadas en la reacción química de oxidación emiten radiaciones electromagnéticas al desactivarse, pasando del estado excitado al fundamental. Existen dos tipos: quimioluminiscencia directa e indirecta o "sensibilizada".

Para la determinación de los niveles séricos de vitamina D mediante quimioluminiscencia, en los análisis rutinarios se utiliza el producto comercializado bajo el nombre de Diasorin Liaison.

Actualmente el uso de la quimioluminiscencia como técnica analítica para la detección de múltiples compuestos, está despertando mayor interés, debido a que presenta una alternativa muy sensible, exacta y con pocas interferencias con respecto a otros métodos.

## ABSTRACT

The active forms of vitamin D are important elements in clinical practice for their biological significance, whose study has increased in recent years. Vitamin D plays the role of regulating the metabolism of calcium and phosphorus. It is also a preventive factor of chronic diseases such as cardiovascular diseases, diabetes, cancer and autoimmune diseases. Due to the possible role of vitamin D in these pathologies, have been searched methods to determine plasma vitamin D levels, which are accurate and effective.

The analytical assay chosen for this bibliographical review is that of chemiluminescence, which is based on the generation of electronically excited species in the process of different chemical reactions, which are usually oxidations. The excited species originated in the chemical reaction of oxidation emit electromagnetic radiations when deactivating, passing from the excited state to the fundamental. There are two types: direct and indirect chemiluminescence or "sensitized".

For the determination of serum vitamin D levels by chemiluminescence, the marketed product under the name of Diasorin Liaison is which is used for routine analyses.

Currently the use of chemiluminescence as an analytical technique for the detection of multiple elements, is growing greater interest, because it presents a very sensitive, accurate and with little interference, compare with other methods.

## 2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 2.1 Significación y origen de la vitamina D

La vitamina D es una vitamina liposoluble, cuya principal función es la formación y mineralización ósea. También esta relacionada con el sistema inmune, ya que se le ha reconocido la participación en procesos de crecimiento y diferenciación de células tales como macrófagos, células dendríticas, células B y T. Se sabe que la deficiencia de esta vitamina, la hipovitaminosis D, se produce en patologías crónicas como la diabetes mellitus tipo I(1,2), enfermedades cardiovasculares(2,3), cáncer (2,4), así como algunas enfermedades autoinmunes(2), como son el lupus eritematoso sistémico (LES) y la artritis idiopática juvenil (AIJ) consideradas de enfermedades de riesgo para la situación de déficit de vitamina D.

Los factores de riesgo que se sabe que favorecen la situación de hipovitaminosis D son:

- a) Ingesta escasa
- b) Latitud
- c) Poca exposición a luz solar
- d) Temporada estacional
- e) La obesidad
- f) Combinación ambiental
- g) Uso de corticoides
- h) Otros factores(5).

La vitamina D se encuentra de manera natural en dos formas principales: vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) y vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol) (Figura 1A). La vitamina D<sub>2</sub> se puede obtener de las plantas que están sometidas a la radiación ultravioleta y por la suplementación dietética. La vitamina D<sub>3</sub> se obtiene, en su mayoría, por síntesis endógena a partir de la exposición al sol y solo una pequeña cantidad a partir de los alimentos derivados de animales. La síntesis endógena se ve influenciada por muchos factores, tales como son el grosor y color de la piel, el tiempo de exposición al sol y la temporada.

### 2.2 Metabolismo de la vitamina D

En la capa de Malpighi de la piel expuesta a la radiación solar, la vitamina D<sub>3</sub> y pro-vitamina D<sub>2</sub> (7-dehidrocolesterol y ergosterol, respectivamente) se transforman en pro-vitamina D que gracias a la temperatura corporal normal sufre una isomerización, para transformarse en la forma biológicamente activa de la vitamina D. A diferencia de los suplementos dietéticos, la exposición continua a la radiación solar(UV) no conduce a toxicidad por vitamina D, debido a que el exceso de pre-vitamina\_D se convierte en lumisterol y taquisterol, formas inactivas, proceso que se invierte cuando los niveles de pre-vitamina D caen. Una vez formada, la vitamina D pasa de las células de la piel a la circulación sanguínea donde se acopla a una proteína específica ( $\alpha$ 1-globulina), llamada proteína de unión a la vitamina D (VDBP) para su transporte en plasma; esta proteína se considera el principal transportador de todos los metabolitos de la vitamina D. En el hígado la vitamina D, por medio de enzimas del citocromo P<sub>450</sub> hepático, especialmente las oxidasas de CYP27A y CYP2R1 que son Esterol

27-hidroxilasa y 25-hidroxitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilasa respectivamente, es metabolizada a 25-hidroxitamina D (25(OH) D), también conocida como calcidiol. La 25(OH) D, viaja por circulación sistémica hacia los riñones y a otros tejidos, para su posterior hidroxilación. En los riñones, la oxidasa (25-hidroxitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilasa) de CYP27B1, convierte el calcidiol en 1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D), principal metabolito activo de la vitamina D también llamado calcitriol. Diferentes células, entre ellas macrófagos activados, queratinocitos y células óseas, producen localmente 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Figura 1B). (6–8).

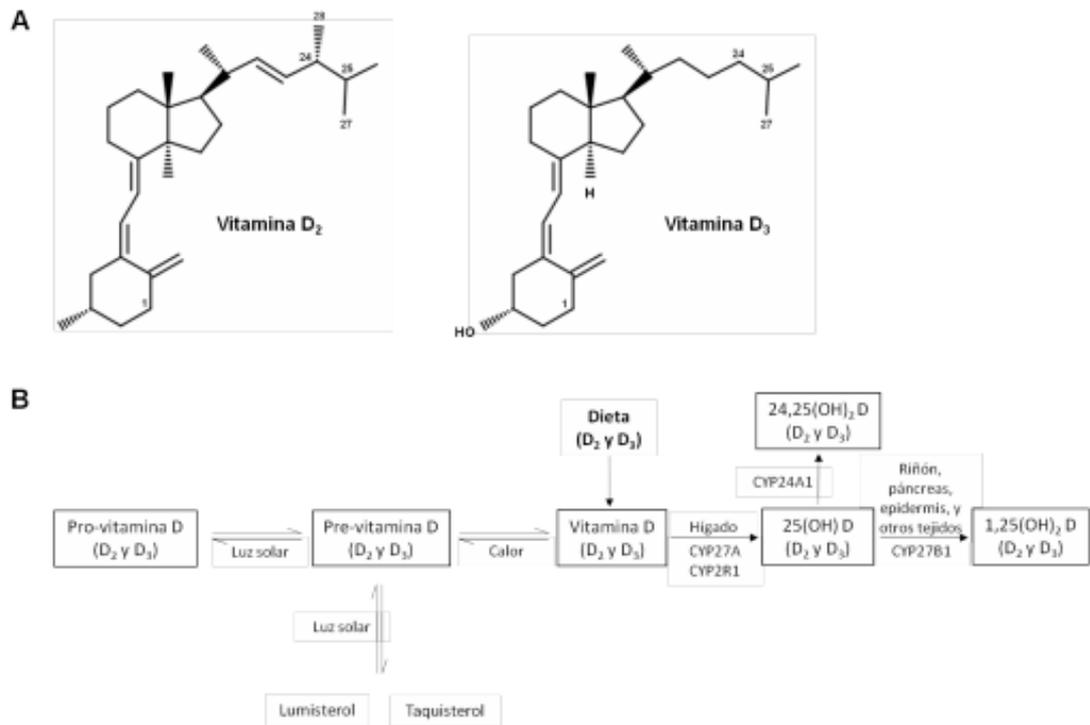


Figura 1.- (A) estructuras químicas y (B) Metabolismo de la vitamina D

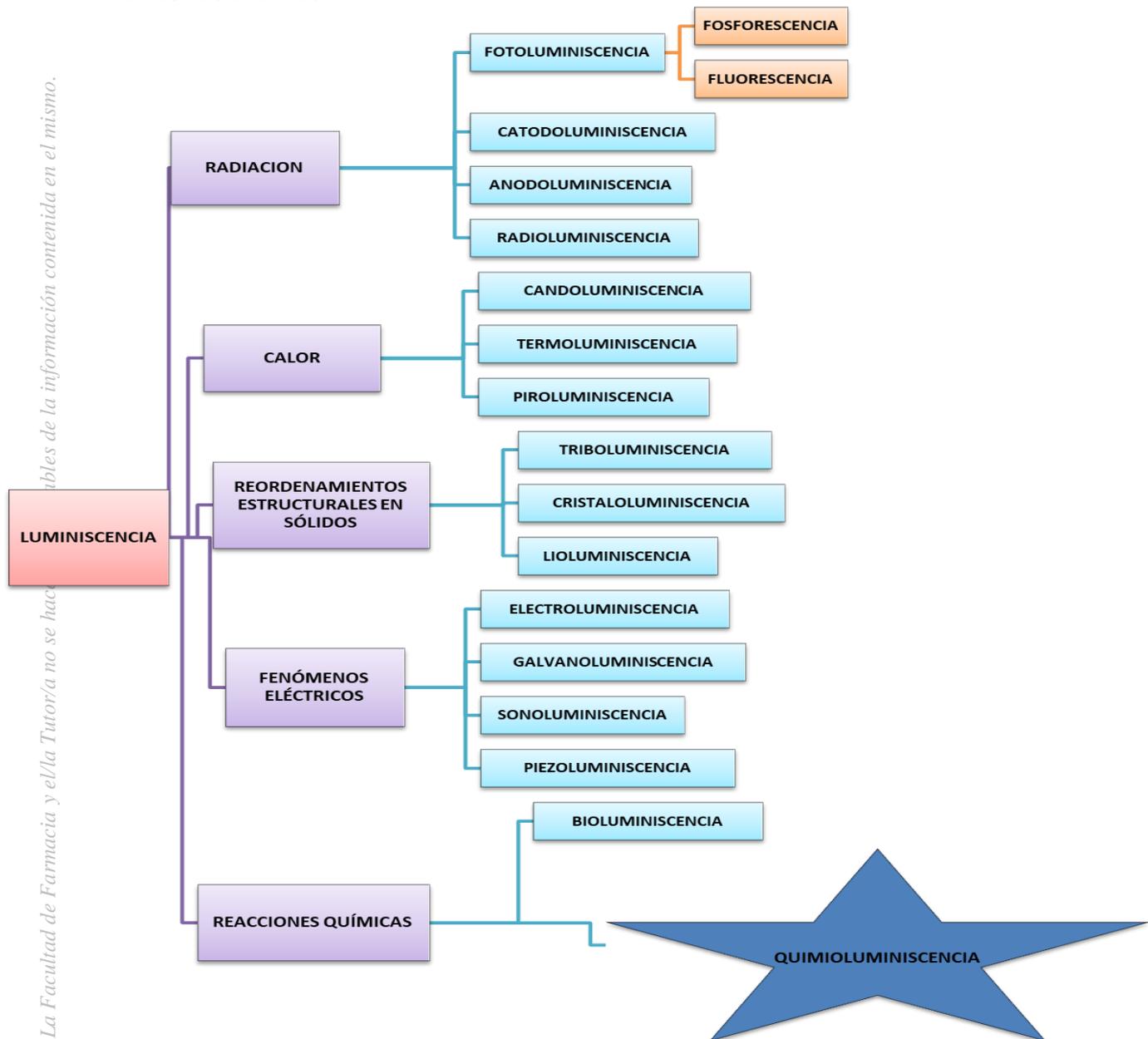
La capacidad de la luz ultravioleta para activar la síntesis de las formas pre-vitamina D, la convierte en un sistema de señalización y activación de diversas vías metabólicas(9). Para la determinación de la concentración de la vitamina D en muestras biológicas se emplea la 25 (OH) D, la cual es el biomarcador más preciso en un organismo(10).

### 2.3 Técnicas para el análisis de vitamina D

Para su cuantificación se utiliza normalmente métodos basados en cromatografía líquida (HPLC), ensayo competitivo de proteínas por quimioluminiscencia, radioinmunoensayo de alta y baja frecuencia de muestreo, métodos automático de quimioluminiscencia y en cromatografía líquida de espectrometría de masas en tándem(11), el método seleccionado es la quimioluminiscencia.

La luminiscencia se puede definir como un proceso de emisión de luz por especies electrónicamente excitadas a temperatura ambiente (12).

Los procesos de luminiscencia se clasifican según la forma en la que se generan las especies en estado excitado.



## 2.4 Quimioluminiscencia

La quimioluminiscencia se define como la emisión de la radiación electromagnética (normalmente en la región del visible o del ultravioleta) producida por una reacción química. Si la radiación proviene de organismos vivos se define como bioluminiscencia.

La intensidad de emisión depende de la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción quimioluminiscente. Para que se dé la quimioluminiscencia es necesario que la reacción produzca un exceso de energía, lo cual es bastante frecuente en reacciones redox, pero el hecho de que este exceso de energía se disipe con emisión quimioluminiscente, depende en gran medida de la estructura molecular de los intermedios o productos de reacción.

En general la medida de la radiación quimioluminiscente obedece dos mecanismos básicos(Fig.2):

- Quimioluminiscencia directa: Se parte de dos reactivos, A y B, normalmente un sustrato y un oxidante, en presencia de algunos cofactores, los cofactores son necesarios en una o mas ocasiones para convertir los subestratos en formas reactivas capaces de reaccionar. A y B reaccionan dando un intermedio de reacción en un estado electrónicamente excitado. Este intermedio, al relajarse hasta el estado fundamental, emite un fotón. A veces, en estas reacciones, se requiere un catalizador que disminuya la energía de activación y aumenta el rendimiento cuántico de la reacción quimioluminiscente.

- Quimioluminiscencia indirecta (sensibilizada o de transferencia de energía): El mecanismo es el mismo para la formación del intermedio electrónicamente excitado, pero para mejorar la sensibilidad analítica se emplea como mediador un fluoróforo, al cual le transfiere la energía, de forma que el fluoróforo se excita (con la energía radiante que proviene del intermedio de la reacción quimioluminiscente) y al volver a su estado fundamental emite radiaciones electromagnéticas.

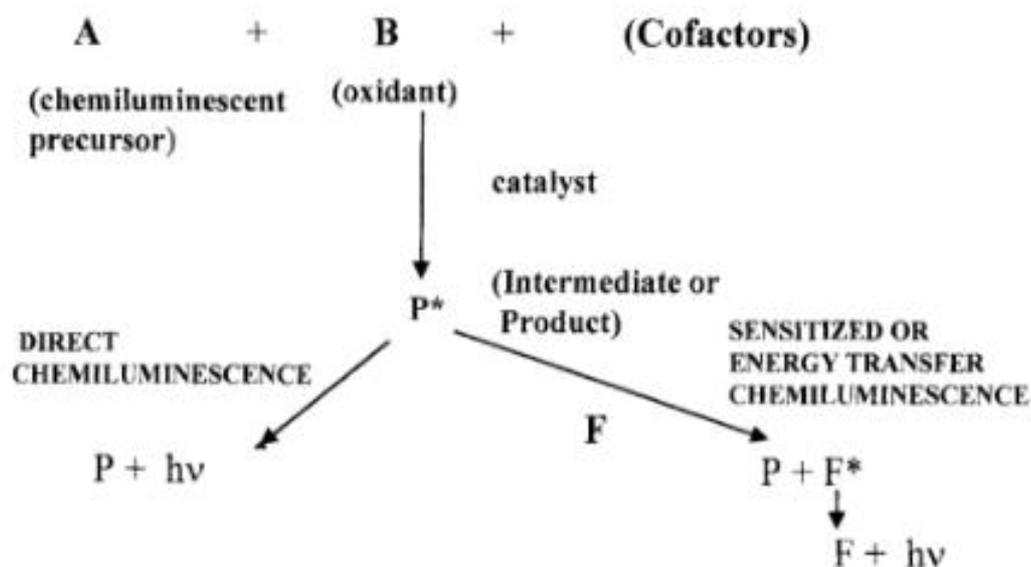


Figura 2.- Tipos de reacciones quimioluminiscentes. P: producto; F: sustancia fluorescente.

Por tanto, los procesos quimioluminiscentes comprenden los siguientes pasos:

1. Reacción química inicial que proporciona el intermedio o producto.
2. Conversión del exceso de energía química en excitación electrónica de este intermedio.
3. Transferencia de energía en el caso de la quimioluminiscencia indirecta.
4. Emisión de la luz por parte de las especies excitadas. El rendimiento cuántico de una reacción quimioluminiscente, dependerá por tanto de los rendimientos de los cuatro pasos implicados en los mecanismos. (13)

Todas estas etapas dan lugar a una gran variedad de aplicaciones prácticas de la quimioluminiscencia en fase sólida, líquida y gaseosa.

Entre los factores que influyen en la emisión de quimioluminiscencia encontramos:

- La estructura química del precursor quimioluminiscente.
- La naturaleza y concentración de otras sustancias que afectan el proceso quimioluminiscente y que favorecen otros procesos competitivos no radiantes.
- El catalizador seleccionado.
- La presencia de iones metálicos, implicados en los procesos de oxidación.
- La temperatura, pH y fuerza iónica.
- La hidrofobicidad del disolvente y la composición de la disolución
- La presencia de aceptores de la energía transferida(14).

Las principales ventajas de los sistemas quimioluminiscentes que los hacen adecuados para el análisis cuantitativo en química analítica son:

- Elevada sensibilidad y amplio intervalo dinámico de concentraciones, llegando en algunos casos a límites de detección del orden de los femtomoles.
- No excitación de las muestras por vía radiante, por tanto, no requiere fuente de excitación externa, lo que se traduce en ausencia de dispersión y de señales de fondo, en la reducción de interferencias debidas a procesos de excitación no selectivos y en la utilización de una instrumentación más sencilla que otros procesos luminiscentes.
- Versatilidad: Se puede utilizar la técnica para determinar cualquiera de las especies que participan en el proceso quimioluminiscente: sustratos, catalizadores, inhibidores, fluoróforos, especies que dan reacciones acopladas aumentando o disminuyendo la concentración de los reactivos implicados en la reacción quimioluminiscente.
- Se acoplan fácilmente como método de detección en cromatografía de líquidos, electroforesis capilar o inmuno-análisis.

Entre las limitaciones de estas reacciones para el análisis, los siguientes parámetros se han de tener perfectamente controlados:

- Los factores experimentales que afectan al rendimiento cuántico y la velocidad de reacción. Estos son: la estructura química del precursor quimioluminiscente, la naturaleza y concentración de sustancias que favorecen procesos competitivos no radiantes, el catalizador elegido, la temperatura, la fuerza iónica, la presencia de aceptores de la energía transferida, la presencia de iones metálicos, la hidrofobicidad del disolvente y la composición de la disolución.
- El tiempo de medida de la señal, debido a que la emisión quimioluminiscente varía en función del tiempo. Tras la mezcla de los reactivos, la emisión de luz alcanza inmediatamente un máximo y después cae hasta la línea base en un rápido destello menor que un segundo o en emisión continua que puede durar desde minutos a horas.

En la Figura 3, se muestra un ejemplo de la variación de la señal quimioluminiscente con el tiempo, para la reacción del luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando Cr(III) como catalizador (concentración final Cr(III) 5.5 g/l). Como se puede observar, la emisión es muy rápida, aproximadamente de 1 segundo, y por tanto, el tiempo al que se registre la señal será decisivo.

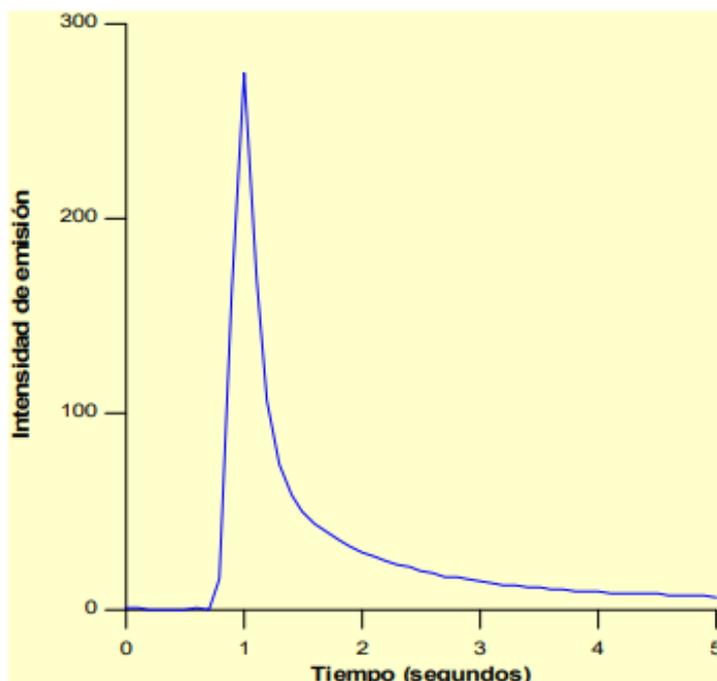


Figura 3.- Intensidad de emisión quimioluminiscente frente al Tiempo

### 2.5 Tipos de reacciones

Las reacciones en **fase sólida** han sido las menos aplicadas debido a que son reacciones muy limitadas por la débil emisión, acompañada de la oxidación de muchos materiales orgánicos. Los sólidos se calientan en presencia de oxígeno y la emisión quimioluminiscente es proporcional a la velocidad de reacción. En ausencia de oxígeno, la emisión quimioluminiscente se produce debido a la descomposición de los peróxidos formados. Se puede recoger la emisión directa de estas especies o la indirecta (exaltando la intensidad de quimioluminiscencia por adición de fluoróforos).(15)

En **fase gaseosa**, se han utilizado combinados con cromatografía gaseosa (utilizando por ejemplo la reacción quimioluminiscente del ozono), cromatografía de fluidos supercríticos (reacciones del nitrógeno y el sulfuro), y también con detectores de gases no cromatográficos en los que se requiere una respuesta rápida como el detector quimioluminiscente.

Las reacciones quimioluminiscentes en **fase líquida**, son aplicables en la determinación de un amplio rango de analitos, desde elementos metálicos como cromo y cobalto a niveles traza, hasta fármacos como tiopronina o azitromicina.

Principales reacciones quimioluminiscentes en fase líquida.

Reacción	Analitos	$\lambda_{\text{máx, em}}$	Rendim. cuántico*
Oxidación del luminol en medio básico acuoso	Catalizadores (Cr(III), Co(II),...), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , luminol..	425 nm	0.01
Oxidación del luminol en dimetilsulfóxido	Superóxido	500 nm	0.05
Oxidación de la lucigenina con peróxido de hidrógeno alcalino	Cu(II),Pb(II), Hg(II), I <sup>-</sup> , ...	440 nm	0.016
Oxidación de lofina en medio etanólico con hidróxido sódico	Na <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , lofina	525 nm	-
Oxidación de perioxalatos	Proteínas, Cl <sub>2</sub> , porfirinas, derivados del DnsCl,...	Depende del sensibilizador	0.05-0.5
Reducción de tris(2,2'-bipiridil)rutenio(III)	Aminas, Aminoácidos, Alcaloides, ión oxalato,...	610 nm	-
Oxidación de alcaloides con permanganato potásico en medio ácido en presencia de polifosfatos	Alcaloides, anestésicos, aminoácidos, indoles, ácido ascórbico, fenoles, ..	680 nm	-
Oxidación de D-luciferina con luciferasa dependiente del ATP pH 8.6	ATP, enzima luciferasa, Mg(II),...	560 nm	0.88

\*La intensidad de emisión de una reacción depende del rendimiento cuántico, que es una medida de la eficiencia de la reacción quimioluminiscente. Los rendimientos cuánticos van desde 1 · 10<sup>15</sup> (QL ultradébil) hasta cerca de 1 (procesos bioluminiscentes).

## 2.6 Tipos de reactivos utilizados

Las reacciones quimioluminiscentes se utilizan con éxito para la detección sensible de analitos de interés en clínica. Algunos de los reactivos son:

- El luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona) se oxida casi cuantitativamente a 3-aminoftalato en medio básico tanto en disolventes polares como apolares. El oxidante más usado suele ser el peróxido de hidrógeno, siendo la reacción catalizada por iones metálicos o metacomplejos (figura 4A) El luminol y el  $H_2O_2$  reaccionan y liberan energía fotónica formando la quimioluminiscencia con un color azulado y brillante. La reacción de oxidación del luminol, es el ejemplo más conocido en reacciones directas, ha sido aplicada para la determinación de iones metálicos que actúan como catalizador, enzimas( peroxidasas, compuestos hemáticos, etc), ciertos oxidantes, inhibidores o sustancias que son fácilmente oxidables y que son determinadas indirectamente por la disminución de emisión de quimioluminiscencia.
- Ésteres de acridinio, que presentan como ventaja respecto al luminol, que la reacción de quimioluminiscencia se produce solo con peróxido de hidrógeno en medio alcalino, originándose N-metilacridona en estado excitado(figura 4B) Se emplea en inmunoanálisis, marcando las proteínas. Presentan una sensibilidad muy alta debido al mayor rendimiento de quimioluminiscencia en comparación con las reacciones en las que se utiliza luminol.

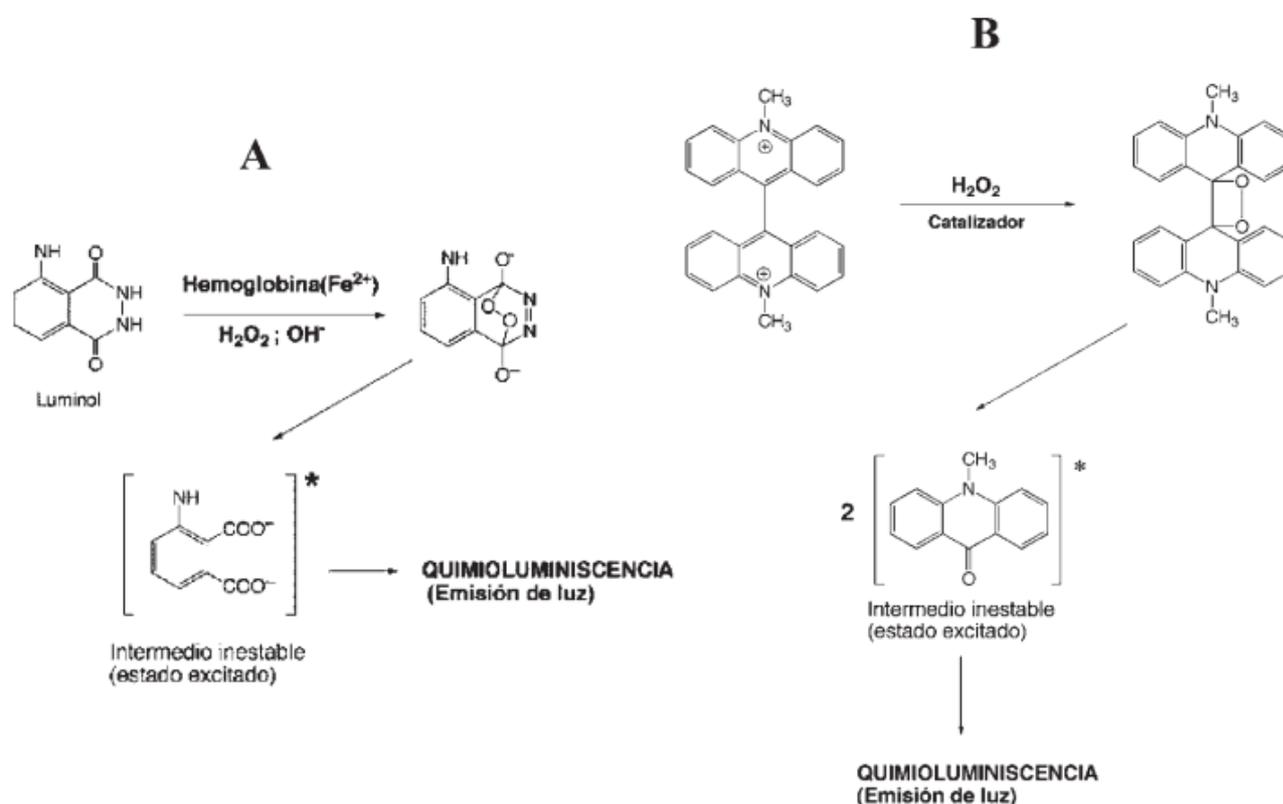


Figura 4.- Reacción quimioluminiscente del luminol(A) y de los derivados de N-metilacridinio(B).

- Los derivados de peroxioxalato. Con estos reactivos se requiere el empleo de quimioluminiscencia indirecta o sensibilizada. Se produce la oxidación por peróxido de hidrógeno de un éster aril oxalato en presencia de fluoróforo. A través de un intermediario de alta energía, 1,2-dioxetanodiona, que forma un complejo de carga con el fluoróforo, donando un electrón al intermediario. Este electrón es transferido al fluoróforo, que alcanza un estado excitado y al regresar al estado fundamental, produce una emisión de fluorescencia característica del fluoróforo. Esta reacción se aplica en la determinación de un gran número de compuestos en las que se produce peróxido de hidrógeno, siendo por tanto útiles para la determinación de sustancias altamente fluorescente (ej. Hidrocarburos aromáticos policíclicos) o compuestos que no siendo fluorescentes puede convertirse en fluorescentes. (16,17)

Una característica diferenciadora de las reacciones anteriores del luminol y de los derivados de acridinio es que el pH del medio es ligeramente ácido para las reacciones sensibilizadas de los peroxioxalatos.

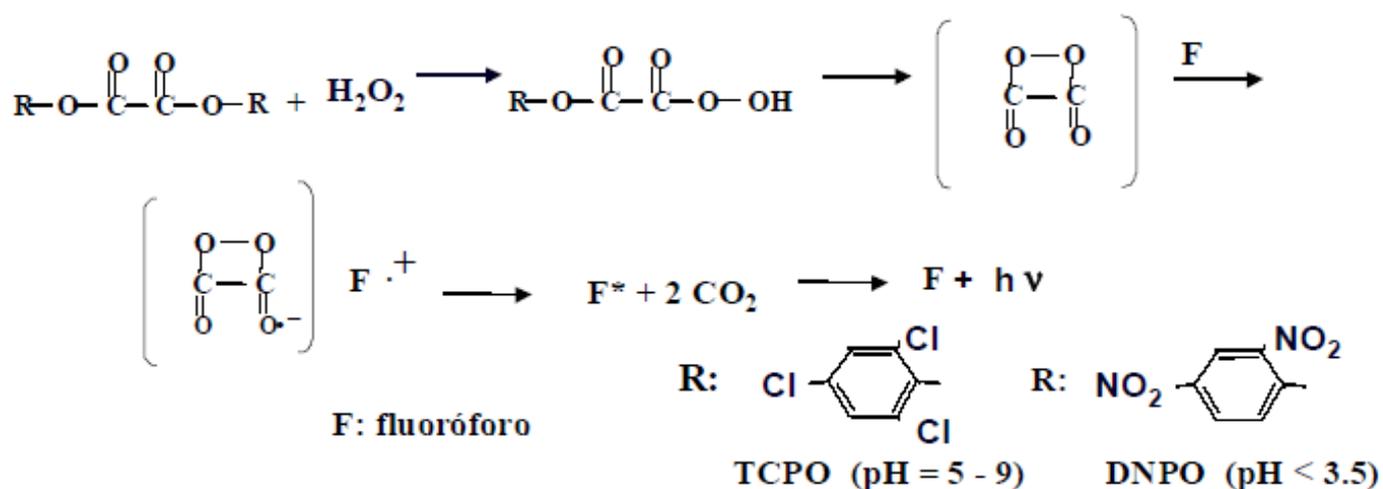


Figura 5.- Mecanismo propuesto para la reacción con peroxioxalatos.

## 2.7 Instrumentación: Luminómetro.

La medida de luz emitida es un indicador de la cantidad de analito presente y al instrumento básico que es capaz de realizar estas medidas se le llama luminómetro. Este incluye una célula de reacción, un compartimento cerrado a la luz, un dispositivo de inyección y mezcla de reactivos y/o muestra, un detector de luz y un sistema de adquisición y procesador de señal (**Fig.6**). En el compartimento cerrado se coloca la célula de reacción con objeto de que toda la luminiscencia sea captada por el detector. La función del compartimento es mantener la mezcla de reactivo y muestra, a una temperatura adecuada y en completa oscuridad a fin de que no alcance radiación interferente el detector de la luz externa. En las técnicas de QL, una vez mezclados los reactivos y la muestra, comienza la reacción quimioluminiscente y la intensidad de la emisión que se está produciendo, disminuye una vez que los reactantes se han agotado. Esto supone que el carácter de la emisión quimioluminiscente es transitorio, y que la escala de tiempo depende de la reacción en cuestión, que va de un corto flash a una emisión

continua. Este hecho es crucial para la selección del sistema más conveniente para la incorporación de los reactivos. (14,18)

Dependiendo de la configuración del dispositivo y del método de introducción de muestra y reactivos, los sistemas pueden clasificarse en: estáticos (introducción de cantidades discretas de reactivos y muestra en un recipiente) o sistemas en flujo.

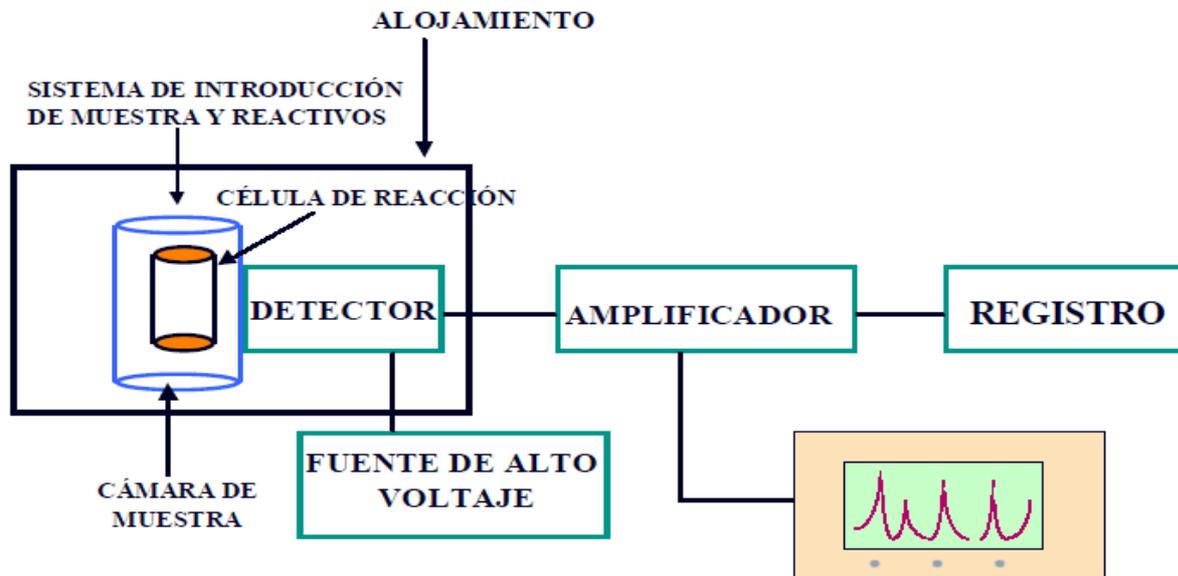


Figura 6.- Configuración esquemática de un luminómetro.

El tipo de célula de reacción va depender de que la reacción de QL se lleve a cabo en fase líquida, sólida o gaseosa, siendo un requerimiento esencial para su diseño que el máximo de intensidad se produzca cuando la mezcla analito-reactivo quimioluminiscente esté frente al detector. Tanto en los métodos estáticos como los de flujos, la magnitud de la intensidad de QL es inversamente proporcional al volumen de la célula. Normalmente, es posible usar cualquier material que sea transparente a la radiación en la región UV y visible del espectro y que sea compatible con la muestra y los reactivos oxidantes utilizados en la reacción. Habitualmente se utiliza vidrio, cuarzo, plástico acrílico u otros.

Hay cuatro requerimientos básicos para el detector, que constituye la parte crítica del luminómetro (22):

- Debe ser capaz de detectar una señal luminosa de varios órdenes de magnitud de intensidad (desde unos pocos fotones por segundo a decenas de millones por segundo)
- Debe ser sensible al menos en la región espectral de 400-600 nm, idealmente en la región completa del visible (380-750 nm) incluso en la regiones pertenecientes al IR cercano.
- La señal registrada por el detector debe estar relacionada directamente con la intensidad de luz que ha llegado a él, idealmente directamente proporcional en todo el rango de longitudes de onda requerido. La señal producida por el detector debe poder ser fácilmente leída, registrada y analizada.
- La velocidad de respuesta del detector debe ser más rápida que la velocidad de la reacción de quimioluminiscencia.

Un ejemplo es el Fluorímetro Hitachi F-4500, 700v (Tokio, Japan) equipado con una celda de 1 cm de camino óptico.



### 3. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo de revisión bibliográfica se centraron en varios aspectos.

Por un lado, una breve descripción del metabolismo de la vitamina D y su importancia en la salud.

La comprensión de la quimioluminiscencia.

Y por último, el uso de las técnicas quimioluminiscentes para la determinación de la vitamina D, junto con la comparación de la misma frente a otras técnicas disponibles como es el RIA.

### 4. METODOLOGÍA

La búsqueda bibliográfica, se realizó: a) La vitamina D, así como b) Los métodos analíticos quimioluminiscentes para su determinación. Esta búsqueda se realizó a través de Science Direct, Pubmed, Google-académico y en la biblioteca on-line de la Universidad Complutense de Madrid.

Los límites en la búsqueda se establecieron de acuerdo con los siguientes criterios. Primero se eligieron artículos de revisiones, artículos de investigación y de divulgación, publicaciones de estudios de resultados obtenidos de ensayos clínicos, de los últimos años. En la búsqueda se utilizaron palabras clave tanto en inglés como en castellano: “vitamina D” (vitamin D), “implicación de la vitamina D” (uses of vitamin D), “quimioluminiscencia” (chemiluminescence), “técnicas analíticas” (analytical assay), “CLIA”, “Diasorin Liaison”, “RIA”, entre otros.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ante las nuevas implicaciones atribuidas a la vitamina D, y su asociación a enfermedades tales como la diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, autoinmunes y mortalidad. Se ha defendido la determinación de sus niveles en la población(16). La cuantificación de los metabolitos de la vitamina D en el plasma es un desafío porque son lipofílicos, están estrechamente unidos a la PAD y sus concentraciones plasmáticas son muy bajas, en el rango nanomolar para 25-OH D<sub>3</sub> y 25-OH D<sub>2</sub> y niveles picomolar para 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. Los inmuno-análisis para 25-OH D y 1,25-(OH)<sub>2</sub> D miden la concentración total de metabolitos porque no pueden distinguir entre las formas D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>(19).

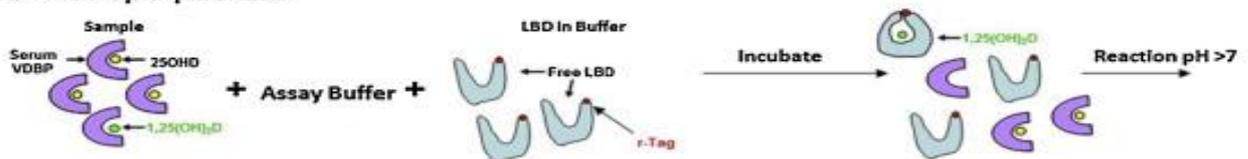
La determinación de la vitamina D en plasma en laboratorios clínicos y de investigación, mediante análisis comerciales se realiza a través de los inmuno-análisis quimioluminiscentes (CLIA).

Dentro de los inmuno-análisis quimioluminiscentes encontramos el Diasorin Liaison, el cual se basa en un inmuno-análisis competitivo directo con detección quimioluminiscente.

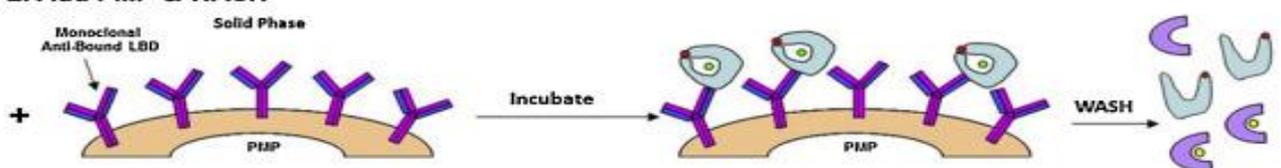
En un primer lugar la muestra de suero se incuba con el dominio de unión al ligando del receptor de la vitamina D. Bajo las condiciones de incubación la transferencia de 1,25-(OH)<sub>2</sub> D de la proteína de unión a la vitamina D(VDBP), al dominio de unión al ligando(LBP) mediante una disolución tampón que contiene 10% de etanol se ve favorecida en gran medida. En segundo lugar, partículas magnéticas recubiertas con Mab 11B4 (anticuerpos monoclonales contra el dominio de unión al ligando-1,25-(OH)<sub>2</sub> D) son añadidas a la mezcla de reacción. Después de la incubación, los materiales no unidos (metabolitos inactivos de vitamina D), se eliminan mediante un ciclo de lavado. Finalmente en el tercer paso ocurre una segunda incubación, donde el conjugado Mab con un marcador quimioluminiscente (isoluminol) específico de LBD se añade y tras la unión a la fase sólida unida al complejo de LBD-1,25-(OH)<sub>2</sub> D el sándwich esta completado.

Después de una segunda etapa de lavado para eliminar el conjugado no unido, se añaden reactivos de inicio de una reacción quimioluminiscente. El pulso de luz emitido es medido por el fotomultiplicador, y proporciona una señal directamente proporcional a la cantidad de 1,25-(OH)<sub>2</sub> D presente en la muestra.(19, 20)

### STEP 1: Sample plus LBD



### STEP 2: Add PMP & WASH



### STEP 3: Add Conjugate and WASH/READ

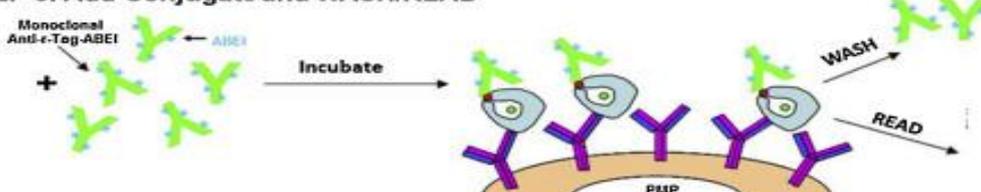


Figura 7.- Esquema del nuevo ensayo 1,25-(OH)<sub>2</sub> D. Descripción general de los componentes, las incubaciones y los pasos de lavado del ensayo totalmente automatizado que se ejecutará en un instrumento LIAISON® XL. El tamaño de muestra requerido es de 75 µl, y el tiempo para el primer resultado es de 65 min. PMP: partículas paramagnéticas; ABEI: derivado del isoluminol.

Otro inmuno-análisis, en este caso basado en la medida de radioactividad y no de quimioluminiscencia es el radioinmunoanálisis (RIA), el cual se realiza mediante un procedimiento de dos pasos. En el primero se extrae rápidamente la 25OH D y otros metabolitos hidroxilados presentes en el suero, mediante acetonitrilo. En la segunda etapa la muestra se somete a un RIA de equilibrio de antígeno( vitamina D) y anticuerpo, siendo incubada la vitamina D con el anticuerpo y el trazador, un antígeno radioactivo durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después se produce la separación de la fracción libre y de la fracción unida al anticuerpo, a través de una segunda incubación, con otro anticuerpo durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación mediante el empleo de una disolución tampón adecuada se rompen las uniones no específicas, y se procede a una centrifugación de las muestras y a medir la radioactividad en el precipitado mediante un contador gamma, como el contador ANRS Abbott Laboratories.(20)

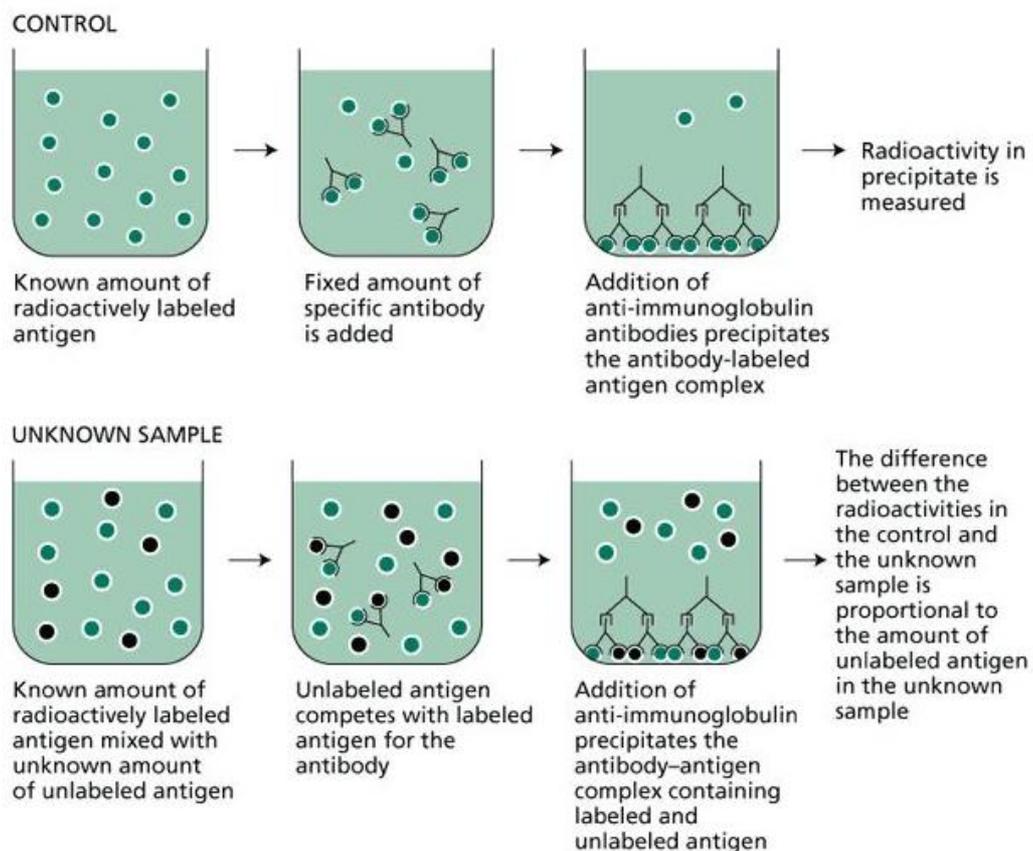


Figura 8.- Esquema general del proceso de radioinmunoanálisis.

Al comparar ambos métodos analíticos se observaron diferencias entre los resultados obtenidos, dado que el analito 25OH D es difícil de cuantificar por su hidrofobicidad y sus concentraciones plasmáticas bajas. Además la detección por igual de 25OH D<sub>2</sub> y de 25OH D<sub>3</sub> representa un desafío en los estudios revisados, sobre todo en los en los ensayos con unión a la proteína ligadora de la vitamina D, debido a que las proteínas de unión muestran mayor afinidad por 25OH D<sub>3</sub> que por 25OH D<sub>2</sub>.

**TABLA I.** Coeficientes de variación de 25OHD medidos por RIA y QLIA.  
 Se emplearon para el cálculo los controles comerciales provistos por el fabricante

Método	Concentración de 25-(OH)-VD (ng/mL)	CV % Intraensayo	Concentración de 25-(OH)-VD (ng/mL)	CV % Interensayo
RIA	15,4	10,6	13,8	19,9
	51,0	8,4	58,6	12,8
	n=34		n=40	
QLIA	17,2	8,0	15,0	13,2
	58,9	7,0	53,2	6,5
	n=10		n=12	

En la publicación escogida para la comparación de ambos métodos las concentraciones de 25-OHD la midieron en suero de 45 pacientes: 8 hombres y 37 mujeres. Las mediciones de 25-OHD las realizaron con un RIA y un QLIA automatizado (LIAISON), ambos DiaSorin. Calcularon los coeficientes de variación intraensayo (CV intra) e interensayo (CV inter) para ambos métodos. Análisis estadístico: la comparación entre métodos la realizaron con los programas Analyse-it y Med Calc. Consideraron significativa una  $p < 0.05$ . (20)

tor/a no se hacen responsables

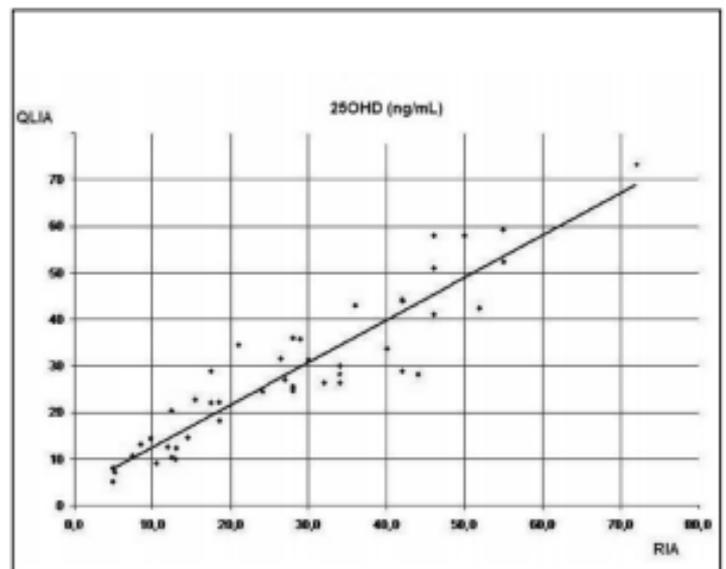
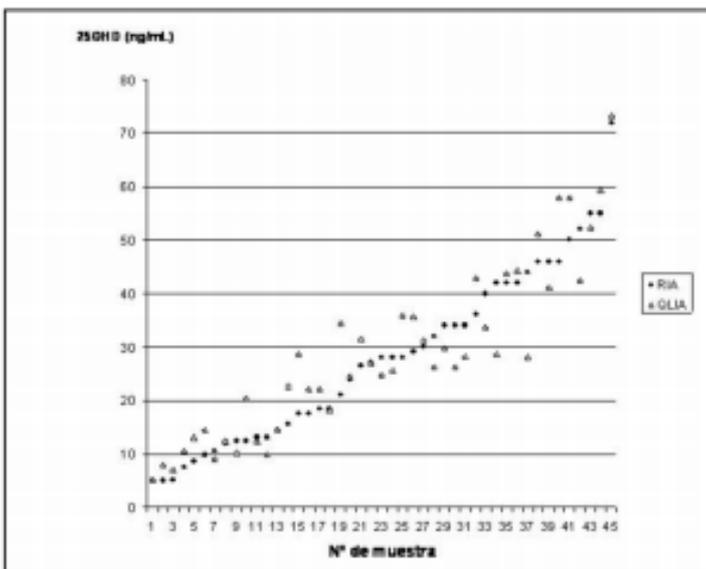


Figura 9.- Datos de 25OHD por RIA y CLIA (n=45)

Figura 10.- Correlación entre los resultados de 25OHD medidos por RIA y CLIA. Datos expresados en ng/mL. La ecuación de la recta es  $y = 9.9129x + 3.3154$ .  $R^2 = 0.8573$ .  $n = 45$  ( $p < 0.0001$ )

Foto: imbbajo tiene

Ambos ensayos muestran una alta correlación y una buena precisión (bajos valores de CV%). La diferencia en el número de muestras y ensayos que se utilizó para determinar los CV inter e intraensayo para una y otra metodología se debió a que el RIA fue el método en uso en laboratorio durante varios años, mientras que el CLIA es de reciente incorporación. Hallando una correlación lineal aceptable ( $R^2 = 0.85$ ) entre ambas metodologías, lo que indica que ambas son adecuadas para la determinación de la concentración de 25OHD. EN esta publicación llegaron a la conclusión de necesitar mayor número de casos es necesario a fin de confirmar esta hipótesis.(20)

## 6. CONCLUSIÓN

En los últimos años se ha observado la importancia de la vitamina D, y su deficiencia en diferentes patologías.

Las publicaciones sobre de la vitamina D han aumentado de manera exponencial. Podríamos decir que la vitamina D se considera según algunos autores, el “analito del milenio”. La cuantificación de la vitamina D constituye un marcador biológico fiable para cuantificar su concentración plasmática(21,22).

Según la bibliografía recogida, actualmente existen varias alternativas disponibles para la medición de los metabolitos de la vitamina D, como la cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) que es según varios artículos la mejor opción como método de referencia para la medida de 25 OH D, pero necesita de una instrumentación costosa, personal cualificado, por lo que es difícil su uso en la rutina de los laboratorios clínicos. Respecto los inmuno-ensayos competitivos, el RIA ha sido el más utilizado, pero su inconveniente es que necesita de instalaciones con las medidas de prevención y seguridad para medidas de radioactividad. En los artículos basados en inmuno-análisis se comentan que en los últimos años se ha producido una demanda exponencial de este tipo análisis, junto con la aparición en el mercado de diferentes inmuno-análisis automatizados como Abbott, Liason, etc; los cuales utilizan anticuerpos o proteínas de unión como ligandos, y quimioluminiscencia como marcador de señal, y que pueden ser integrados en plataformas analíticas, ha hecho que la mayoría de los laboratorios clínicos utilicen estos métodos, que ofrecen mejor rendimiento, haciendo de esta técnica un campo de investigación muy interesante en una amplia variedad de disciplinas, que incluyen técnicas de separación en análisis químico, biológico, farmacéutico, biomédico y alimentario, control de calidad, etc.

Esta revisión bibliográfica se centró en la quimioluminiscencia, en el ensayo Diasorin Liaison, un inmuno-análisis competitivo directo, que al compararlo con otros inmuno-análisis como es el RIA, se pudo observar que ambas técnicas son adecuadas para la determinación de 25(OH) D. Algunos autores que han comparado las concentraciones de 25(OH) D obtenidas por los métodos RIA y Diasorin Liaison, han hallado resultados controvertidos, ya que algunos encontraron lecturas en Liaison inferiores a las del RIA en concentraciones bajas, pero mayores en altas concentraciones. La discrepancia de resultados de vitamina D afecta en la utilidad clínica del informe del laboratorio y por tanto en interpretación y decisión del médico. Los artículos señalan la importancia de definir y armonizar los métodos analíticos para la Vitamina D a fin de que los resultados obtenidos puedan ser comparables.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. González-Molero I, Rojo G, Morcillo S, Pérez-Valero V, Rubio-Martín E, Gutierrez-Repiso C, et al. Relación entre déficit de vitamina D y síndrome metabólico. *Med Clínica*. 6 de junio de 2014;142(11):473-7.
2. Bikle DD. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem Biol*. 20 de marzo de 2014;21(3):319-29.
3. Judd S, Tangpricha V. Vitamin D Deficiency and Risk for Cardiovascular Disease. *Circulation*. 29 de enero de 2008;117(4):503-11.
4. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC. Vitamin D for Cancer Prevention: Global Perspective. *Ann Epidemiol*. 1 de julio de 2009;19(7):468-83.
5. Rosiles VH, Salazar CD, Velazquez RM, Ruiz RR, Clark P. Determinación de concentraciones séricas de 25(OH) D en niños con lupus eritematoso sistémico y artritis idiopática juvenil. *Bol Méd Hosp Infant México*. marzo de 2015;72(2):99-105.
6. Kumar R. The metabolism and mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Kidney Int*. diciembre de 1986;30(6):793-803.
7. Gaby SK. *Vitamin Intake and Health: A Scientific Review*. CRC Press; 1990. 236 p.
8. Desarrollo e Innovación HIC-FCV, Serrano Díaz N, Guío Mahecha E, Coordinadora del Laboratorio de Medicina Genómica y Metabolismo HIC-FCV, González A, Profesional de Apoyo del Laboratorio de Medicina Genómica y Metabolismo HIC-FCV, et al. Cuantificación de Vitamina D: de la Investigación a la Práctica Clínica. *Biosalud*. 20 de junio de 2017;16(1):67-79.
9. Gilaberte Y, Aguilera J, Carrascosa JM, Figueroa FL, Romaní de Gabriel J, Nagore E. La vitamina D: evidencias y controversias. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. octubre de 2011;102(8):572-88.
10. Torrubia B, Alonso I, López-Ramiro E, Mahillo I, De la Piedra C. Comparación entre dos inmunoensayos automatizados por quimioluminiscencia para la cuantificación de 25(OH) vitamina D. *Rev Osteoporos Metab Miner*. junio de 2016;8(2):70-4.
11. Mata-Granados JM, Ferreiro-Verab C, Luque de Castro MD, Quesada Gómez JM. Determinación de los metabolitos principales de vitamina D en suero mediante extracción en fase sólida en línea con cromatografía líquida espectrometría de masas en tándem. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2010;2(2). Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=360933650008>
12. Faraldos M, Goberna C. Técnicas de análisis y caracterización de materiales. 2011. Disponible en: [https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:gagrwdpO64gJ:scholar.google.com/&hl=es&as\\_sdt=0,5](https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:gagrwdpO64gJ:scholar.google.com/&hl=es&as_sdt=0,5)

13. Meseguer Lloret S. Métodos quimioluminiscentes en química analítica.[Ph.D. Thesis]. Universitat de València; 2004. Disponible en: <http://www.tdx.cat/handle/10803/10245>
14. Isacson U, Wettermark G. Chemiluminescence in analytical chemistry. *Anal Chim Acta*. 1 de febrero de 1974;68(2):339-62.
15. Pontén E, Viklund C, Irgum K, Bogen ST, Lindgren ÅN. Solid Phase Chemiluminescence Detection Reactors Based on in Situ Polymerized Methacrylate Materials. *Anal Chem*. 1 de enero de 1996;68(24):4389-96.
16. Valero Chávez FJ, Luengo Pérez LM, Cubero Juárez J. Adecuación de las peticiones de los niveles de vitamina D al laboratorio. *Nutr Hosp*. octubre de 2016;33(5):1159-63.
17. Olives AI, Castillo BD, Martín MA. Técnicas analíticas luminiscentes y de separación aplicadas a la identificación y cuantificación de biomarcadores. *Monogr Real Acad Nac Farm*.2010;0(0). Disponible en: <http://analesranf.com/index.php/mono/article/view/1067>
18. Wrg B. Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo. 2001;27.
19. Ding S, Schoenmakers I, Jones K, Koulman A, Prentice A, Volmer DA. Quantitative determination of vitamin D metabolites in plasma using UHPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 1 de septiembre de 2010;398(2):779-89.
20. Fuentes AM, Fierro MF, Medici M, Perharic C, Drnovsek M, Ercolano M, et al. Medición de 25-Hidroxivitamina D Sérica: Comparación de dos Inmunoensayos.
21. Vitamina D: visión desde el laboratorio. *Nefrología*. abril de 2012;(3 Suppl). Disponible en: <http://doi.org/10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2012.Apr.99>
22. Valcour A, Zierold C, Podgorski AL, Olson GT, Wall JV, DeLuca HF, et al. A novel, fully-automated, chemiluminescent assay for the detection of 1,25-dihydroxyvitamin D in biological samples. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1 de noviembre de 2016;164:120-6.
23. Culliford B.J. *The Examination and Typing of Bloodstains in the Crime Laboratory*; US Gov' t Printing Office: Washinton DC, 1971.

## 8. ABREVIATURAS

- 1,25- dihidroxivitamina D → (1,25(OH)<sub>2</sub>D)
- 1,25- dihidroxivitamina D<sub>3</sub> → (1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>)
- 25- hidroxivitamina D → (25(OH) D)
- 25- hidroxivitamina D<sub>3</sub> → (25-OH D<sub>3</sub>)
- Dominio de unión a la proteína → LBD
- Dominio de unión al ligando-1,25-(OH)<sub>2</sub> D → LBD-1,25-(OH)<sub>2</sub> D
- Miembro de la subfamilia A de la familia 27 del citocromo P450 → (CYP27B1)
- Miembro de la subfamilia A de la familia 27 del citocromo P450 → (CYP27A)
- Miembro de la subfamilia R del citocromo P450 de la familia 2 → (CYP2R1)
- Artritis idiopática juvenil → (AIJ)
- Coeficiente de variación → (CV%)
- Cromo<sup>3+</sup> → (Cr(III))
- Infrarrojo → IR
- Inmuno-análisis quimioluminiscentes → (CLIA)
- Lupus eritematoso sistémico → (LES)
- Oxidos de nitrógeno → (NO<sub>x</sub>)
- Proteína de unión a la vitamina D → (VDBP)
- Radioinmuno-análisis → (RIA)
- UV → Ultravioleta