



ANÁLISIS DE VITAMINA D EN MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE QUIMIOLUMINISCENCIA

AUTOR: María Jesús Rodríguez Almansa

INTRODUCCIÓN

La **vitamina D** es una vitamina liposoluble, cuya principal función es la formación y mineralización ósea, También participa en procesos de crecimiento y diferenciación celular.

Su deficiencia esta relacionada con patologías como la Diabetes mellitus tipo I, enfermedades cardiovasculares, cáncer, así como algunas enfermedades autoinmunes.

La vitamina D se encuentra de manera natural de dos formas: Vitamina D2 (ergocalciferol) y vitamina D3 (colecalciferol).

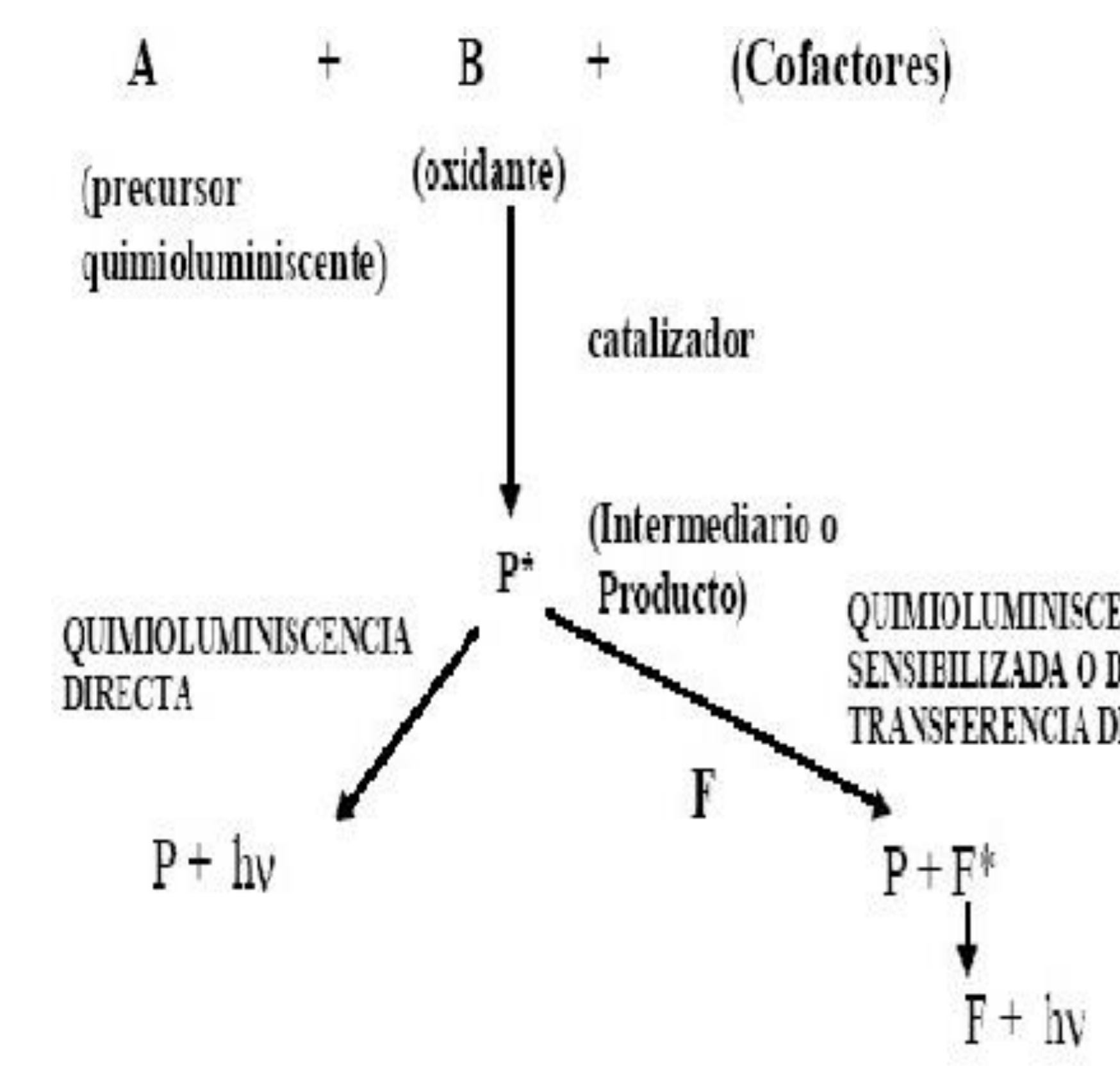
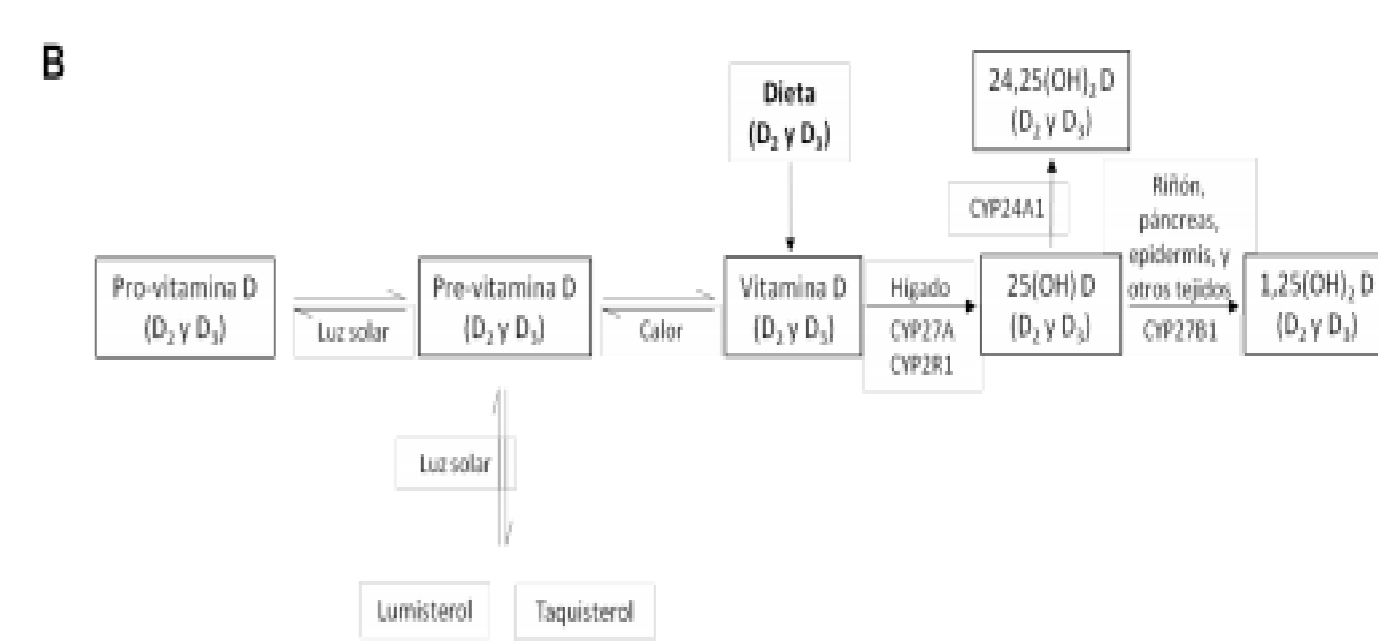
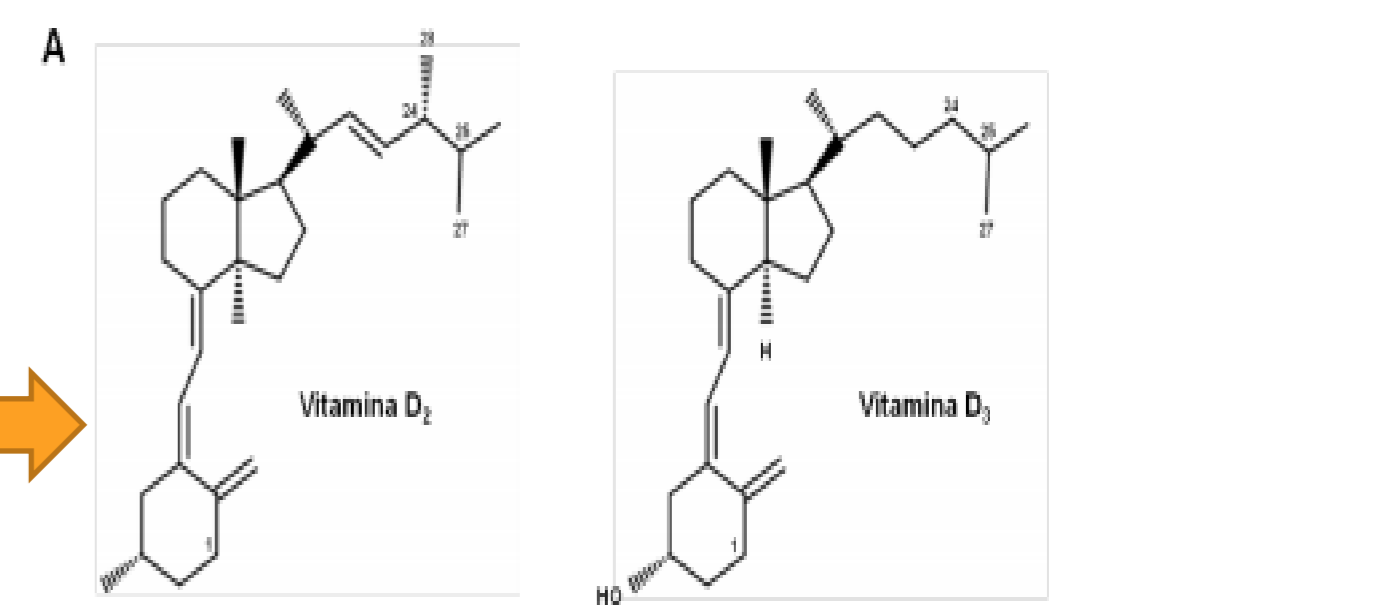
Para la cuantificación de la vitamina D en muestras biológicas se emplea la 25-(OH)D, la cual es el biomarcador más preciso. Se usan normalmente métodos de cromatografía líquida(HPLC), ensayos competitivos de proteínas por quimioluminiscencia, radioinmunoensayos y métodos automáticos quimioluminiscentes y cromatografía líquida de espectrometría en tándem.

La quimioluminiscencia se define como la emisión de la radiación electromagnética producida por una reacción química

En general existen 2 mecanismos de medida de la radiación quimioluminiscente: DIRECTO E INDIRECTO(o de transferencia de energía)

Los procesos quimio luminiscentes 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.



VENTAJAS

- Elevada sensibilidad y amplio intervalo dinámico de concentraciones.
- No excitación de las muestras por vía radiante
- Versatilidad.
- Se acoplan fácilmente como método de detección en cromatografía de líquidos, electroforesis capilar o inmuno-análisis.

LIMITACIONES

- Los factores experimentales que afectan al rendimiento cuántico y la velocidad de reacción. (estructura química del precursor quimioluminiscente, naturaleza y concentración de sustancias ,catalizador, temperatura, la fuerza iónica)
- El tiempo de medida de la señal, debido a que la emisión quimioluminiscente varía en función del tiempo.

OBJETIVOS

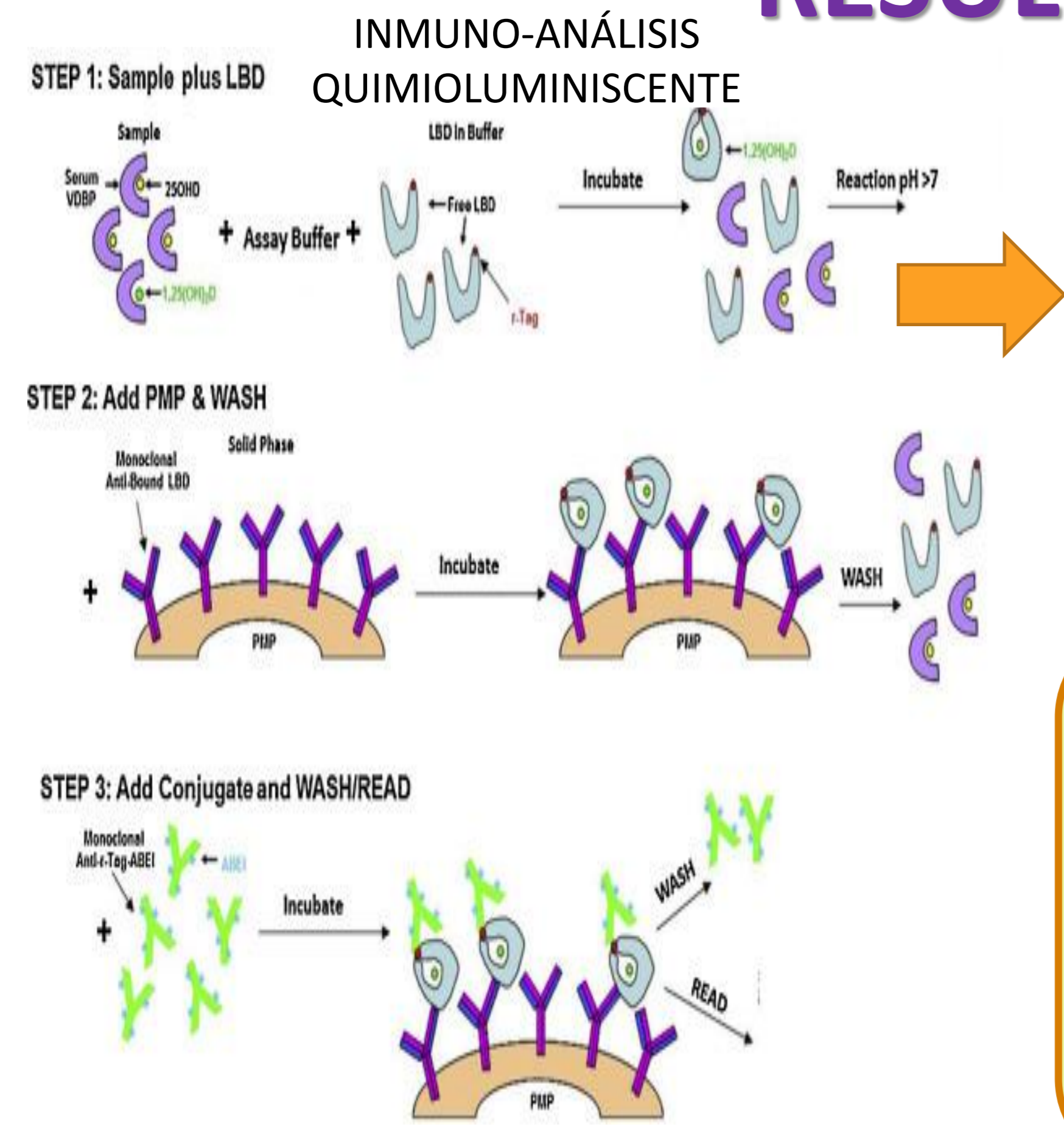
- Breve descripción del metabolismo de la vitamina D y su importancia en la salud.
- Comprensión de la quimioluminiscencia.
- Uso de las técnicas quimioluminiscentes para la determinación de la vitamina D, junto con la comparación de la misma frente a otras técnicas disponibles como es el RIA.

METODOLOGÍA

Revisión bibliográfica en Science Direct, Pubmed, Google-académico y en la biblioteca on-line de la Universidad Complutense de Madrid.

Palabras clave: "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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

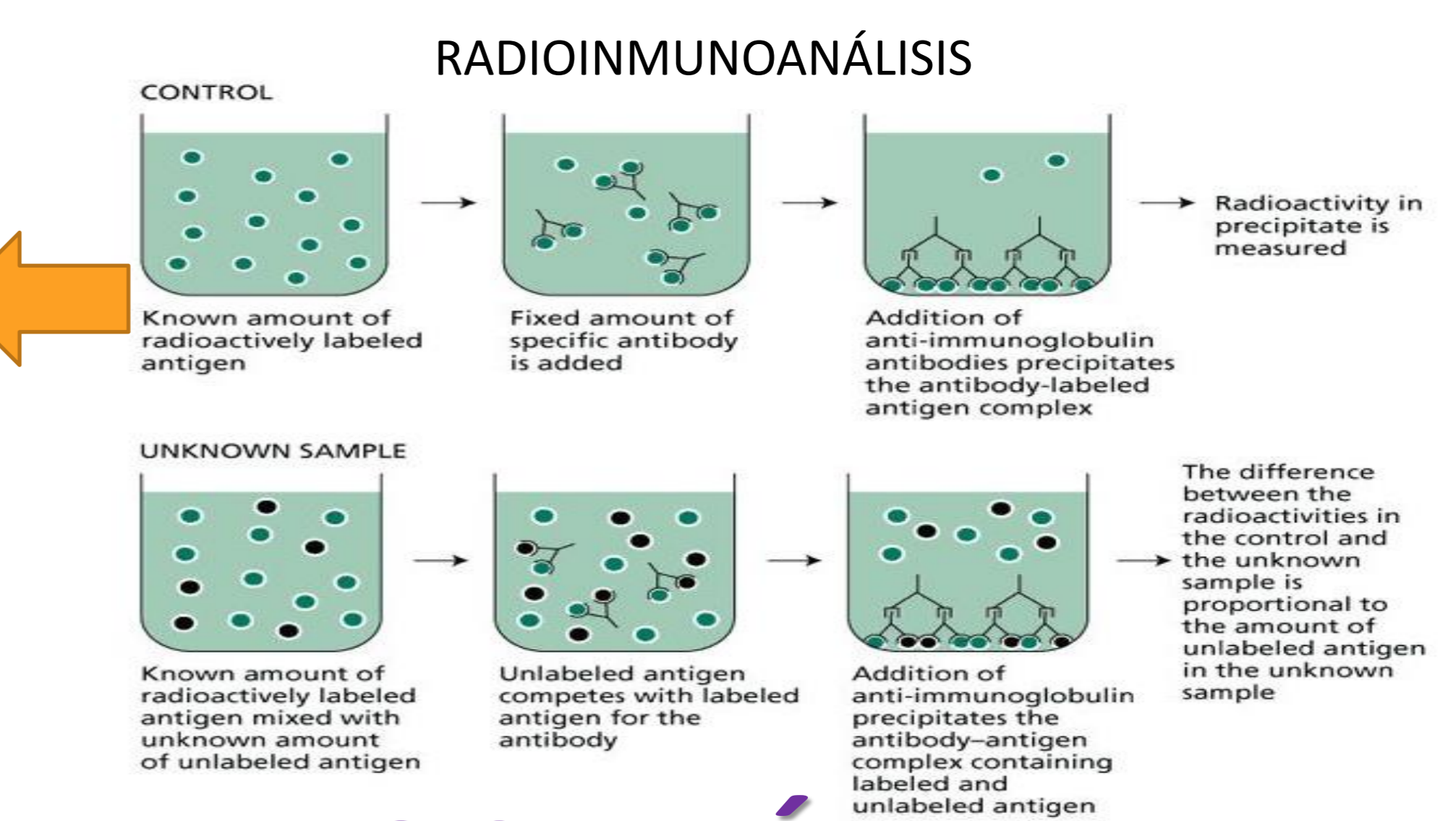


Determinación de vitamina D mediante Diasorin Liaison (inmuno-análisis con detección quimioluminiscente)

1. Incubación de la muestra con el dominio de unión al ligando del receptor de vitamina D.
2. Adición de partículas magnéticas recubiertas con Mab 11B4.
3. Los materiales no unidos son eliminados mediante lavado.
4. Segunda incubación, donde el conjugado de Mab con marcador quimioluminiscente (isoluminol) específico al dominio de unión al ligando se añaden.
5. Segundo lavado, y adición de reactivos de inicio de una reacción quimioluminiscente.
6. El pulso de luz emitido, es medido por un fotomultiplicador, que proporciona una señal directamente proporcional a la cantidad de 25-(OH)D presente en al muestra.

Radioinmunoanálisis (RIA)

1. Extracción de 25-(OH)D y otros metabolitos del suero.
2. Equilibrio antígeno (vitamina D) - anticuerpo , mediante incubación.
3. Separación de la fracción libre de la fracción unida al anticuerpo por una segunda incubación.
4. Rotura de las uniones no específicas y centrifugación de la muestra.
5. Medición de la radioactividad mediante un contador gamma (ANRS Abbott Laboratories)



CONCLUSIÓN

- Las publicaciones sobre de la vitamina D han aumentado de manera exponencial.
- Los metabolitos de la vitamina D constituyen un marcador biológico fiable para cuantificar su concentración de vitamina D plasmática.
- Existen varias alternativas disponibles para la medición de los metabolitos de la vitamina D.
- Aparición en el mercado de diferentes inmuno-análisis automatizados como Abbott, Liaison, etc; los cuales ofrecen mejor rendimiento, haciendo de esta técnica un campo de investigación muy interesante en una amplia variedad de disciplinas.
- Al comparar el ensayo Diasorin Liaison, con RIA, se puede observar que ambas técnicas son adecuadas para la determinación de 25(OH) D.
- 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.

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. Kumar R. The metabolism and mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D3. Kidney Int. diciembre de 1986;30(6):793-803.
6. Meseguer Lloret S. Métodos quimioluminiscentes en química analítica. [Ph.D. Thesis]. Universitat de València; 2004. Disponible en: <http://www.tdx.cat/handle/10803/10245>
7. 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.
8. Fuentes AM, Fierro MF, Medici M, Perharic C, Drnovsek M, Ercolano M, et al. Medición de 25-Hidroxivitamina D Sérica: Comparación de dos Inmunoensayos.
9. 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.