

## **PRACTICAS DE AMPLIACION DE BIOQUIMICA CLINICA.-**

– Tiene 2 partes :

### **1.ENZIMOLOGIA CLINICA.**

– Dónde determinamos.

- Concentraciones catalíticas de 3 enzimas:
  - ALT (Alanina aminotransferasa).
  - AST ( Aspartato aminotransferasa).
  - FAL ( Fosfatasa alcalina).
- Determinación del origen de la actividad de la Fosfatasa alcalina en suero de pacientes, por la determinación de sus Isoenzimas, gracias a la medición de 2 parámetros físico-químicos, como son:
  - Movilidad eletrofóretica.
  - Incidencia de la acción de la Neuroaminidasa.

– Así evaluamos el suero de 4 pacientes y determinamos las diferentes patologías.

### **2. HORMOLOGIA CLINICA.**

– Medimos 2 hormonas que se miden a la par, pero tienen diferente estructura, diferente método de detección, etc. :

- TSH: son grandes, es hipofisaria y con naturaleza peptídica, se detecta mediante un ELISA NO COMPETITIVO o tipo Sandwich, dónde nosotros marcamos Anticuerpo.
- T3 : son pequeñas, es tiroidea, el método es un ELISA COMPETITIVO, dónde marcamos Antígeno.

## **DETERMINACION DE LA HORMONA T3.-**

– La hormona Tiroxina (T4) y la triyodotironina (T3) circulan en el torrente sanguíneo asociadas a una globulina la llamada TGB, las concentraciones de T3 son inferiores a las de T4, pero su potencial es mucho mayor. La determinación de T3 es una herramienta importante en el diagnóstico de enfermedades tiroideas. La determinación de T3 es también útil en el control de pacientes bajo tratamiento por hipertiroidismo y en pacientes que han interrumpido la terapia antitiroidea. Es especialmente valiosa para la distinción entre pacientes eutiroides e hipertiroides.

– Los niveles de TGB aumentan de una manera análoga a los niveles de T4, una disminución de la concentración de TGB ocasiona una disminución en T3. Aunque estos cambios del nivel de T3 no reflejan el estado tiroideo.

– El protocolo a seguir para este ensayo es el siguiente:

Equilibramos todos los reactivos a temperatura ambiente.

Preparamos un esquema de la placa para poder identificar los pocillos.

|    |        |      |
|----|--------|------|
| M1 | C1     | St 1 |
| M1 | C1     | St 1 |
| M2 | C2     | St 2 |
| M2 | C2     | St 2 |
| M3 | St 0   | St 4 |
| M3 | St 0   | St 4 |
| M4 | St 0.5 | St 0 |
| M4 | St 0.5 | St 4 |

M1 = Paciente 1 C1 = Control 1 St 1 = Estándar 1 ng/ml

M2 = Paciente 2 C2 = Control 2 St 2 = Estándar 2 ng/ml

M3 = Paciente 3 St 0 = Estándar 0 ng/ml St 4 = Estándar 4 ng/ml

M4 = Paciente 4 St 0.5 = Estándar 0,5 ng/ml

Ahora pipeteamos 50  $\mu$ l de muestra, control y referencia estándar a su pocillo correspondiente el cual tendrá fijado en el fondo un anticuerpo policlonal, esto se hace por duplicado.

Agitamos suavemente durante 15 segundos.

Preparar la solución de T3/conjugado (marcado con la peroxidasa), para ello tomamos 240  $\mu$ l de conjugado T3/HRP y lo diluimos 10 veces con el diluyente del conjugado T3 con ANS (8-anilino-1-naftaleno ácido sulfónico) que inhibe la unión de T3 a las proteínas séricas. Para esto ponemos 2.160  $\mu$ l del diluyente. Y ahora ponemos en cada pocillo 100  $\mu$ l de esta solución recién preparada.

Volvemos a agitar suavemente 15 segundos.

Incubamos 1 hora aproximadamente a temperatura ambiente y con agitación.

Vaciamos el contenido de los pocillos en la pila, invirtiendo la placa con rapidez y con la placa invertida la golpeamos contra un papel absorbente o secante.

Lavamos la placa 5 veces, sumergimos en agua destilada, vaciamos rápidamente el contenido y volvemos a golpear contra el papel secante varias veces.

Ahora ponemos 50  $\mu$ l de Sustrato A y 50  $\mu$ l de Sustrato B a cada pocillo.

Agitamos suavemente durante 15 segundos.

Dejamos que se desarrolle la reacción a temperatura ambiente y dentro del cajón para que no interfiera la luz durante 20 minutos que pueden ser menos si aumentamos un poco la temperatura.

Detenemos la reacción con la solución de parada que es H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N añadiendo 100  $\mu$ l por pocillo, esto hace que nuestro color azul de los pocillo vire a un color amarillo, y esta coloración es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente e inversamente proporcional a la cantidad de T3 no marcada en la muestra.

Finalmente leemos la absorbancia en un lector de ELISA a 450 nm.

Resultados:

- Nuestro intervalo de confianza es:

Control 1= 0,47–0,94 ng/ml Nuestro resultado = 0,50 ng/ml

Control 2= 1,00–2,2 ng/ml Nuestro resultado = 1,7 ng/ml

- Nuestros valores de T3 para personas sanas deben estar entre 0,8 – 2 ng/ml. Y son los siguientes.

Paciente 1 = 1,7 ng/ml.

Paciente 2 = 0,86 ng/ml.

Paciente 3 = 0,90 ng/ml.

Paciente 4 = 0,50 ng/ml.

Valoración:

- Podemos decir que nuestros controles entran dentro del intervalo de confianza de la técnica, por tanto nuestro proceso esta validado y nuestras medidas son correctas.
- El único valor que nos indica una variación es el correspondiente al paciente 4 ya que da un valor muy bajo de T3, debemos decir que este valor no es un indicador de hipotiroidismo tan bueno como la de tiroxina, ya que en estos pacientes se tiende a incrementar la producción periférica de triyodotironina para compensar la deficiente producción hormonal de la glándula tiroidea. Así la determinación de la concentración de triyodotironina no es de gran valor en el diagnóstico inicial del hipotiroidismo, pero puede ser útil en el control de la terapéutica adecuada.
- Este valor por sí sólo no nos indica nada pero debemos conjuntarlo con el valor de TSH para poder dar un diagnóstico más acertado.

### **DETERMINACION DE LA HORMONA TSH.–**

– Esta determinación de Tirotropina en suero o plasma, es útil en un diagnóstico de hipotiroidismo primario y secundario. Esta hormona induce a la producción y liberación de tiroxina (T4) y Triiodotironina (T3) por la glándulas tiroides. Vemos que la concentración de TSH es muy baja, pero esta es necesaria para una función tiroidea normal.

– Debido a que posee la cadena diferente y en este hay secuencias de aminoácidos idénticas que pueden ocasionar reacciones cruzadas con algunos anticuerpos TSH policlonales. Por ello usamos anticuerpos monoclonales para eliminar interferencias que nos darían un falso valor de TSH.

– El protocolo a seguir para este ensayo es el siguiente:

Equilibramos todos los reactivos a temperatura ambiente.

Preparamos un esquema de la placa para poder identificar los pocillos.

|    |      |       |
|----|------|-------|
| M1 | C1   | St 5  |
| M1 | C1   | St 5  |
| M2 | C2   | St 10 |
| M2 | C2   | St 10 |
| M3 | St 0 | St 20 |

|    |      |       |
|----|------|-------|
| M3 | St 0 | St 20 |
| M4 | St 1 | St 0  |
| M4 | St 1 | St 20 |

M1 = Paciente 1 C1 = Control 1 St 5 = Estándar 5 UI/ml

M2 = Paciente 2 C2 = Control 2 St 10 = Estándar 10 UI/ml

M3 = Paciente 3 St 0 = Estándar 0 UI/ml St 20 = Estándar 20 UI/ml

M4 = Paciente 4 St 1 = Estándar 1 UI/ml

Ahora pipeteamos 50  $\mu$ l de muestra, control y referencia estándar a su pocillo correspondiente el cual tendrá fijado en el fondo un anticuerpo monoclonal, esto se hace por duplicado.

Agitamos suavemente durante 15 segundos.

Y ahora ponemos en cada pocillo 100  $\mu$ l de la solución de anti-TSH marcado con peroxidasa de rábano..

Volvemos a agitar suavemente 15 segundos.

Incubamos 1 hora y media aproximadamente a 37 ° C y con agitación.

Vaciamos el contenido de los pocillos en la pila, invirtiendo la placa con rapidez y con la placa invertida la golpeamos contra un papel absorbente o secante.

Lavamos la placa 5 veces, sumergimos en agua destilada, vaciamos rápidamente el contenido y volvemos a golpear contra el papel secante varias veces.

Ahora ponemos 50  $\mu$ l de Sustrato A y 50  $\mu$ l de Sustrato B a cada pocillo.

Agitamos suavemente durante 15 segundos.

Dejamos que se desarrolle la reacción a 37 ° C y dentro del cajón para que no interfiera la luz durante 30 minutos.

Detenemos la reacción con la solución de parada que es H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N añadiendo 100  $\mu$ l por pocillo, esto hace que nuestro color azul de los pocillo vire a un color amarillo, y esta coloración es directamente proporcional a la cantidad de TSH.

Finalmente leemos la absorbancia en un lector de ELISA a 450 nm.

Resultados:

- Nuestro intervalo de confianza es:

Control 1= 0,15 – 0,29 UI/mL Nuestro resultado = 0,98 UI/ml

Control 2= 6,9 – 7,8 UI/ mL Nuestro resultado = 13,1 UI/ml

- Nuestros valores de TSH para personas sanas deben estar entre 0,53 – 5,1 UI/ml. Y son los siguientes.

Paciente 1 = 0,40 UI/ml.

Paciente 2 = 6,15 UI/ml.

Paciente 3 = 2,11 UI/ml.

Paciente 4 = 2,40 UI/ml.

Valoración:

– Aquí nuestros controles se nos van un poco por arriba de los intervalos de referencia que hemos visto en las hojas de parámetros bioquímicos. Esto puede ser debido a que la incubación no fue la correcta, ya que hay 2 formas de incubar o una hora y media a 37°C, y después otra media hora también a 37°C o incubar toda la noche a temperatura ambiente y la posterior incubación también a temperatura ambiente. También puede ser debido a que este lote no tenga ese intervalo de controles o como no a un mal pipeteo o manejo por nuestra parte, pero hemos de resaltar que la curva de los estándares está correcta y nuestras muestras no reflejan grandes errores.

- Nuestra valoración final según los datos es la siguiente:

- Paciente 1 :

TSH = 0,40 UI/mL Es bajo.

T3 = 1,7 ng/ml Es alto.

– Según estos datos podemos decir que puede presentar una toxicosis T4 florida, ya que aparece la TSH disminuida cerca del valor indetectable y la triyodotironina la tiene dentro de los valores normales pero está cerca del límite superior. También podíamos diagnosticar un bocio simple.

- Paciente 2 :

TSH = 6,15 UI/ml

T3 = 0,86 ng/ml

– Este paciente puede sufrir una tiroiditis de Hashimoto si es eutiroides.

- Paciente 3 :

TSH = 2,11 UI/ml

T3 = 0,90 ng/ml

– Se encuentra dentro de los niveles de salud y este paciente podemos decir que tiene ningún problema de tiroides.

- Paciente 4 :

TSH = 2,40 UI/ml

T3 = 0,50 ng./ml

– Podemos diagnosticar a este paciente un hipotiroidismo hipofisario o hipotalámico.

### **DETERMINACION DE ISOENZIMAS DE FOSFATASA ALCALINA.–**

– Esta determinación se base en una electroforesis, con su estuche especial llamado ISOPAL PLUS, así podremos separar las diferentes isoenzimas de hueso, hígado, intestino y placenta en el suero humano.

– Antes de comenzar con nuestro protocolo de la práctica debemos de preparar las muestras, es decir debemos reactivarlas, poniéndolas a 37°C durante 30 minutos antes de analizarlas. Una vez hecho esto podemos comenzar con el protocolo:

Poner en cubeta de electroforesis 45 ml en cada lado, de tampón de electroforesis ISOPAL.

En el procesador de líquidos debemos tener las cubetas limpias y llenarlas a continuación con agua destilada limpia la primera y con Acido acético 5% la segunda, a razón de unos 300 ml cada una.

Ahora debemos tratar las muestras con neuraminidasa, esto consiste en poner en un eppendorf 25 l de suero de nuestros pacientes y 5 l de neuraminidasa. Y estos 4 eppendorf los ponemos junto a los de las muestras a 37°C durante 30 minutos.

Ahora siguiendo las instrucciones debemos montar el gel correctamente en su cajita para aplicar el tampón de equilibrado ISOPAL durante 30 minutos por lo menos.

Tras este tiempo se retira el gel del tampón de equilibrado y lo ponemos sobre papel de filtro y lo secamos con el secante de geles que luego se desecha.

A continuación aplicamos la plantilla de color morado doblándola correctamente a lo largo y alinearlos en los puntos A del gel de agarosa y presionar con el dedo suavemente para que en el gel nos queden los pocillos marcados.

Una vez tengamos los pocillos listos ponemos 5 l de nuestras muestras tanto sin tratar como tratadas con neuraminidasa. Se debe alternar una muestra de paciente con una muestra tratada con neuraminidasa, cuando terminemos de aplicar esperamos 10 minutos para que las muestras difundan bien por el gel.

Secamos la plantilla con su secante de plantillas y luego lo desechamos.

Colocamos el gel sobre el esqueleto de la cubeta electroforética correctamente, es decir la parte positiva con la positiva y la negativa con la negativa.

Colocamos la cubeta en la fuente de alimentación a 150 voltios y durante 25 minutos.

Tras la electroforesis lo retiramos el gel y lo ponemos en una caja oscura de incubación.

Sobre esta caja y mejor dicho sobre el gel ponemos 2,5 ml de mezcla de suero A + suero B, en la parte superior del gel.

Se cierra la caja de incubación y se incuba en el incubador a 45°C durante 15 minutos o mejor hasta que se observe coloración en el gel.

A los 5 minutos de la incubación debemos redifundir el sustrato por el gel para que llegue a todos los pocillos por igual ya que si le falta el sustrato no se produce la reacción enzimática y no nos daría bandas para poder interpretarlas. Después de redifundir se sigue la incubación durante 10 minutos más.

Ahora ponemos el gel en un marco de geles y lo procesamos en el procesador de líquidos poniéndolo en agua destilada durante 5 segundos y en ácido acético 5 % durante 5 minutos.

Retiramos el marco de geles y secamos por presión durante 2 minutos, ponemos el gel con la agarosa hacia arriba y sobre el ponemos un secante fino, un segundo secante fino humedecido con solución salina, y después dos secantes gruesos y finalmente la prensa de secado.

Tras este proceso ya se puede evaluar el gel visualmente comparando con otro modelo.

– En esta práctica nos surgió el problema de no haber esperado lo suficiente en el proceso de incubación hasta que obtuviéramos color en el gel, y por eso en nuestra electroforesis no se ve apenas ninguna banda, esto ha sido por desconocimiento del tiempo de espera verdadero para la incubación.

#### Preguntas:

¿Por que hay que incubar muestra con y sin neuraminidasa a 37°C?

¿Cómo actúa la neuraminidasa y cuáles son sus consecuencias?

¿Cuál es la razón de tener que redistribuir el sustrato en la acción del revelado de las isoenzimas del FAL?

¿Por que las acciones de fijación y revelado están invertidos frente a lo que hacíamos en un proteinograma o lipidograma?