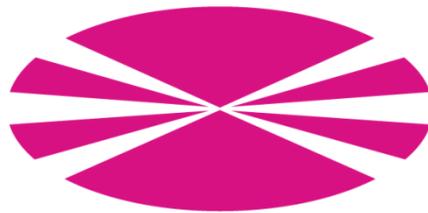


Master en Ciencias, Tecnologías y Gestión Ambiental

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER, JULIO 2015



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Experiencia en el laboratorio de Análisis Clínicos del área de Salud en el CHUAC

Experiencia no laboratorio de Análises Clínicas da área de Saúde no CHUAC

Experience in the clinical analysis laboratory of health area in the CHUAC



Laura Romero Barrenechea

Graduada en Química

Moisés Canle López (Tutor Académico)

Fernando Fernández Rodríguez (Tutor Profesional)

Índice

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
RESUMO.....	4
SUMMARY.....	5
OBJETIVOS.....	6
1. HOSPITAL UNIVERSITARIO A CORUÑA: HISTORIA Y ORGANIZACIÓN.....	7
1. Historia.....	8
2. TÉCNICAS EMPLEADAS: INTRODUCCIÓN, PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS.....	10
2.1 Introducción.....	11
2.2 Servicio de Hematología.....	11
2.2.1 Citometría hemática.....	11
2.2.2 Ejemplos de citogramas y células.....	12
2.3 Servicio de Cromatografía.....	16
2.3.1 Técnica de Inmunodifusión Radial.....	16
a) Alfa-1-antitripsina.....	16
2.3.2 Disacaridasas.....	19
2.3.3 Mucopolisacáridos (GAGs).....	22
2.3.4 Porphirina.....	26
a) Ácido 5-Aminolevulínico (ALA)/Porfobilinógeno (PBG).....	30
2.3.5 Vitamina A/E por HPLC.....	32
2.3.6 Análisis de la Clozapina en suero y plasma humano.....	35
2.4 Sección de Hormonas.....	38
2.4.1 Técnica de radioinmunoensayo (RIA).....	38
a) Testosterona libre-RIA-CT.....	40
b) 17-OH progesterona.....	43
2.4.2 Ensayo Progensa PCA3.....	46
2.4.3 Análisis de Catecolaminas.....	48
2.4.4 Análisis de VMA/HVA/5-HIAA.....	51
2.4.5 Análisis de las Metanefrinas.....	53
2.5 Servicio de análisis Bioquímicos.....	56

Índice

2.5.1	Comparación de niveles de litio sérico por dos métodos comerciales frente a determinación por Absorción Atómica.	56
2.6	Sección de orinas.....	60
2.6.1	Espermiogramas	60
2.7	Robótica utilizada en los laboratorios clínicos	63
3.	CONCLUSIONES	64
4.	ANEXOS	66
5.	BIBLIOGRAFÍA	69

Este apartado está dedicado a declarar la conformidad tanto por el autor de la memoria, como la de los tutores de la entidad y la universidad. Por una parte el tutor de la empresa con su firma consta que ha revisado dicha memoria y que está de acuerdo con lo expuesto en este documento, así como con la prevención de la ley de protección de datos según la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, publicada en <<BOE>> núm. 298, de 14/12/1999. Por otra parte el tutor de la universidad con su firma hace constar que ha revisado la memoria y que la alumna Laura Romero Barrenechea está preparada para defender su Trabajo Fin de Máster. Para que conste:

<p>Moisés Canle López</p> <p>-Decano de la UDC. -Tutor de la UDC.</p> <p>Con DNI: Firma:</p> <p>Fecha:</p>	<p>Fernando Fernández Rodríguez</p> <p>Facultativo Análisis Clínicos del Complejo Hospitalario Univesitario A Coruña- Tutor Profesional</p> <p>Con DNI: Firma:</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>Laura Romero Barrenechea</p> <p>-Autora de la memoria -Alumno de la UDC</p> <p>Con DNI: Firma:</p> <p>Fecha:</p>

Abreviaturas

Abreviaturas

a ₁ -AT Alfa 1 antitripsina	LUC Glandes células no teñidas
AHV Ácido homovalínico	MMLV Murina de moloney
ALA Ácido 5-Aminolevulínico	MPO Mieloperoxidasa
ATIPIC Atípicos	MPS Mucopolisacáridos
AVM Ácido vanililmandélico	NEUT Neutrófilos
CAL Calibrador	NM Normetanefrina
CBG Corticoesteroides	NP Espermatozoides con movilidad no progresiva
CH Citometría hemática	PBG Porfobilinógeno
CHD Enfermedad coronaria	PCA3 Gel del cáncer de próstata 3
EOS Eosinófilos	PEROX Peroxidasa
FT Testosterona libre	PM Peso molecular
FA Fosfatasa alcalina	PSA Antígeno prostático específico
GAGs Mucopolisacaridosis	PLT Plaquetas
GR Glóbulos rojos	PR Espermatozoides con movilidad progresiva
GB Glóbulos blancos	KDa Kilo Dalton
HC Control alto	REAG 1 Reactivo de dilución/lavado
HCT Hematocrito	REAG 2 Reactivo de elución
HEM Hematíes	REAG 3 Reactivo ácido
HGB Hemoglobina	RIA Radioinmunoensayo
HPLC Cromatografía líquida de alta resolución	SB100 Agitador de vórtice
HVA Ácido Homovanílico	SHBG Globulina transportadora de hormonas sexuales
IM Espermatozoides inmóviles	SLPC Síndrome mieloproliferativo crónico
LC Control bajo	TCR Reactivo de captura seleccionada
LH Hormona luterizante	TEP; PET Tomografía de Emisión Positrónica
LLC Leucemia linfoide crónica	TTU Unidades de 10 tubos
VPM volumen plaquetario medio	VMA Ácido Vanilmandélico
LMC Leucemia mieloide crónica	
17P 17 Progesterona	

Abreviaturas

5-HIAA Ácido 5- hidroxindolacético

LPA o Lp(a) Lipoproteína

LUC Glandes células no teñidas

MN Metanefrina

Resumen

El presente trabajo contiene las diferentes tareas realizadas en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Materno Infantil, que tiene como objetivo evaluar los resultados analíticos para poder dar una buena interpretación clínica. En concreto durante mi estancia he rotado por las siguientes áreas: área de hematología, de hormonas, de cromatografía y bioquímica. En estas áreas se estudian muestras biológicas diversas, como sangre, orina, heces, suero, etc.

Me forme en la utilización de cada una de las técnicas de estas secciones y colaboré con el resto de técnicos implicados en el proceso de análisis, así como en su diagnóstico clínico para hacer un seguimiento correcto de la enfermedad.

Resumo

O presente traballo contén as diferentes tarefas realizadas no laboratorio de análises clínicas do Hospital Materno Infantil, que ten como obxectivo avaliar os resultados analíticos para poder dar unha boa interpretación clínica. En concreto durante a miña estanza rotei polas seguintes áreas: área de hematoloxía, de hormonas, de cromatografía e bioquímica. Nestas áreas estúdanse mostras biolóxicas diversas, como sangue, ouriños, feces, soro, etc.

Formeime na utilización de cada unha das técnicas destas seccións e colaborei co resto de técnicos implicados no proceso de análise, así como no diagnóstico clínico para facer un seguimento correcto da enfermidade.

Summary

This work summarizes the different tasks carried out in the laboratories of clinical analyses of the *Hospital Materno Infantil*, that has the objective to evaluate analytical results to give a correct clinical interpretation. During my stay I took part in the activities of different areas: haematology, hormones, chromatography and biochemistry. In these areas I had the opportunity to study different biological samples, such as blood, urine, faeces, serum, etc.

I gained knowledge in the different techniques used in these sections and collaborated with technicians involved in the process of analysis, as well as in the clinical diagnosis for a correct treatment of the disease.

Objetivos

El laboratorio clínico es una especialidad médica que brinda medios de diagnóstico y, como todas ellas, resulta indispensable en la actualidad, algunos de los objetivos del químico como analista clínico son:

- Conocer la metodología analítica, tratamiento, selección diagnóstica, control y fuentes de error de un laboratorio de análisis clínicos
- Evaluar los resultados analíticos y su interpretación clínica.
- Elaborar informes y realizar interconsultas clínicas.
- Detectar complicaciones.
- Ofrecer resultados con un nivel de seguridad y conformidad y que se establezcan las conclusiones acertadas.
- Administrar datos analíticos con exactitud y fiabilidad suficientes en un plazo y con un coste aceptables.

1. Hospital Universitario A Coruña: Historia y Organización

1. Historia

El Hospital Universitario (CHUAC) es un conjunto de centros especializados de atención a la salud, la enseñanza y la investigación en Ciencias de la salud que pertenecen al servicio gallego de Salud (Sergas) con sede en A Coruña.

El CHUAC fue inaugurado en, tiene una superficie de más de 50000 m² y es hoy por hoy el hospital público más grande de toda Galicia. Hoy en día el CHUAC está conformado por los hospitales: Abente y Lago, Teresa Herrera, marítimo de Oza y hospital Virxe de la Xunqueira.

El laboratorio central del CHUAC, ubicado en el materno infantil Teresa Herrera, atiende diariamente una media de dos mil pruebas, buena parte de ellas llegadas de los distintos centros de salud de atención primaria, donde se realiza la recogida de muestras. A esta cifra hay que añadir otro medio millar de peticiones asumidas al día por el laboratorio de atención continuada de la residencia sanitaria, donde se realizan las determinaciones solicitadas por urgencias.



Ilustración 1: Hospital Universitario A Coruña

El Hospital Materno Infantil (anteriormente denominado Hospital Teresa Herrera) fue inaugurado en 1951, en él se encuentran los laboratorios del Servicio de Análisis Clínicos, ubicados en la planta 1^ª. En la actualidad da cobertura tanto a la demanda generada en el complejo hospitalario como a pacientes ambulatorios pertenecientes al área sanitaria de A Coruña y forma especialistas en Análisis Clínicos y en Bioquímica Clínica.¹



Ilustración 2: Hospital Teresa Herrera

Los análisis clínicos que se llevan a cabo son un tipo de exploración complementaria que solicita el médico al laboratorio clínico para confirmar o descartar un diagnóstico.

Forma parte del proceso de atención al paciente y se apoya en el estudio de distintas muestras biológicas mediante su análisis en el laboratorio y brinda un resultado objetivo, que puede ser cuantitativo (un número, como en el caso de la glucosa) o cualitativo (positivo o negativo, como en el caso del PCA_3).

El resultado de un análisis clínico se encuadra dentro de los valores de referencia establecidos para cada grupo de población, y requiere de una interpretación médica. No deben confundirse ambos conceptos, por un lado está el resultado de la prueba de laboratorio realizada, y por otro, la interpretación que el médico dé a esos resultados.

Al realizar un análisis clínico siempre se tienen en cuenta ciertas características propias de cada prueba diagnóstica: especificidad, sensibilidad, valor predictivo, exactitud, precisión y validez (analítica, clínica y útil de dicha prueba), así como la preparación y recogida de la muestra o los intervalos de referencia.

2. Técnicas empleadas: introducción, procedimiento y resultados.

2.1 Introducción

El laboratorio clínico del CHUAC aglutina las siguientes especialidades: análisis clínicos, hematología y hemoterapia, bioquímica Clínica, microbiología, inmunología, genética y hormonas. A partir de aquí presentamos el trabajo en función de las distintas especialidades o servicios:

2.2 Servicio de Hematología

La hematología constituye una parte de la medicina que se basa en el estudio clínico-biológico de las enfermedades de la sangre, de los órganos hematopoyéticos, y de todos los aspectos relacionados con su tratamiento, así como todos los aspectos relacionados con la medicina transfusional (no solo hace mención a la transfusión de componentes sanguíneos sino que incluye también otras actividades como el trasplante de precursores hematopoyéticos o la terapia celular y tisular).

Los servicios de Hematología y Hemoterapia en sus áreas de laboratorio son además, dentro de la estructura hospitalaria, estructuras centrales o servicios básicos, que deben servir con rapidez y calidad al resto de los servicios los estudios y tratamientos solicitados.²

2.2.1 Citometría hemática

El término citometría hemática (en adelante CH) es el más adecuado para denominar a la medición de las células de la sangre (citos= célula, metros= medida, haema, haematos= sangre). La interpretación correcta de toda la información que ofrece una CH posibilita establecer sospechas diagnósticas definidas sobre la enfermedad que causa las alteraciones de la misma. Realiza el análisis detallado de cada uno de los datos que informa, los cuales se pueden dividir en tres grandes grupos: datos de la serie roja, de la serie blanca y de la serie trombocítica. La medición de todos estos parámetros e índices eritrocíticos debe hacerse utilizando contadores de partículas por citometría de flujo.³

i. Componentes ópticos.

- a) Conjunto óptico láser: Se compone de los módulos de iluminador, cubeta y detector. La fuente de luz se basa en un diodo láser que se encuentra alojado en el módulo iluminador. Se enfoca la imagen de una ranura iluminada por la luz del diodo láser a la cubeta. La corriente de muestra/envolvente de la cubeta contiene hematíes (HEM)

Los hematíes y reticulocitos que pasan a través de la cubeta de lectura dispersan la luz en ángulos bajo y alto. Los reticulocitos teñidos absorben un porcentaje de la luz. Los dos fotodiodos de difracción detectan a la luz dispersada, que genera las dos señales siguientes:

- Una señal de difracción de ángulo alto correspondiente a la luz dispersada en ángulos entre 5° y 15°.
- Una señal de difracción de ángulo bajo correspondiente a la luz dispersada en ángulos entre 2° y 3°.

Técnicas realizadas

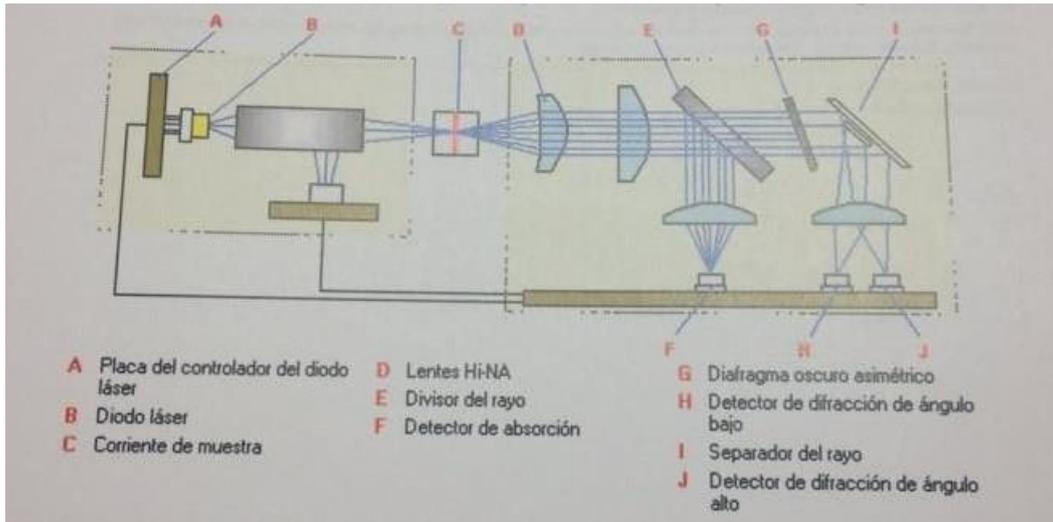


Ilustración 3: Componentes del conjunto óptico láser.

2.2.2 Ejemplos de citogramas y células

Resultados

En las siguientes ilustraciones presentan ejemplos de diferentes células en sangre periférica tanto de la serie roja como de la blanca.

Aquí vemos algunos ejemplos de los frotis sanguíneos analizados (que son un análisis de sangre que mide el número y forma de las células sanguíneas)

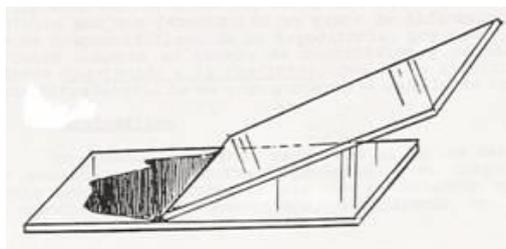


Ilustración 4: Frotis de sangre periférica

Técnicas realizadas

- Ejemplo de linfocito y plaqueta en forma alargada (**ilustración 5**) y un ejemplo de agregado plaquetario (**ilustración 6**).
 - a) Linfocitos: es una célula linfática (se fabrican por células linfoides presentes en la médula ósea y que posteriormente migran a órganos linfoides como el timo, ganglios linfáticos y bazo, constituyen el 99 % de las células linfáticas), que es un tipo de leucocito (glóbulo blanco) comprendido dentro de los agranulocitos. Son los leucocitos de menor tamaño.
 - b) Plaquetas: son células producidas por los megacariocitos en la médula ósea mediante el proceso de fragmentación citoplasmática, circulan por la sangre y tiene un papel muy esencial en la coagulación. Agregado plaquetario: masa de plaquetas juntas y unidas unas con otras.



Ilustración 5: Linfocito y plaqueta alargada

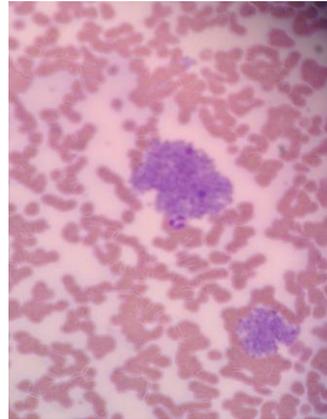


Ilustración 6: Agregado plaquetario

- Ejemplo de dos basófilos uno con una rotura (**ilustración 7**) y otro que se ha vaciado (**ilustración 8**).
 - a) Basófilos: conforman el tipo de leucocito menos abundante en la sangre. Tiene núcleo irregular, difícil de ver por la granulación basófila que lo cubre casi siempre. Tamaño semejante al de los segmentados. Se denomina basófilo a cualquier célula que se tiñe fácilmente con colorantes básicos.

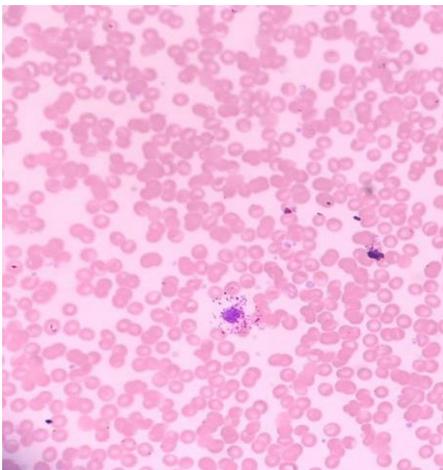


Ilustración 7: basófilo roto

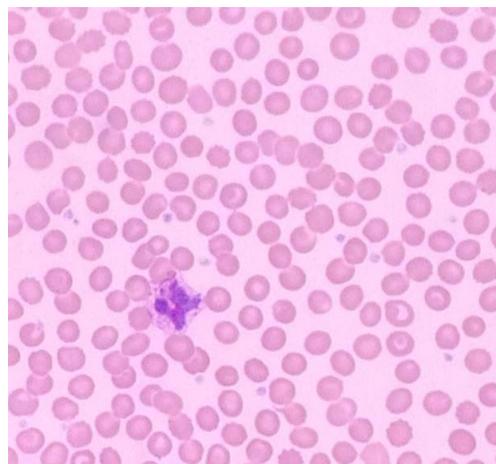


Ilustración 8: basófilo vacío

Técnicas realizadas

- Ejemplo de neutrófilo raramente azurófilo (granulación que puede ser coloreada por la eosina y características de las células tipo granulocitario) (**ilustración 9**) y eritoblastos basófilos (**ilustración 10**) con un citoplasma azulado por tinción.
 - b) Neutrófilos: son el tipo más común de glóbulos blancos. Comprenden aproximadamente entre el 45 y 70% de todos los glóbulos blancos de la sangre.
 - c) Eritoblastos: son células eritropoyéticas. En humanos, el proceso de producción de eritrocitos o glóbulos rojos pasa por varios estados eritroblásticos.

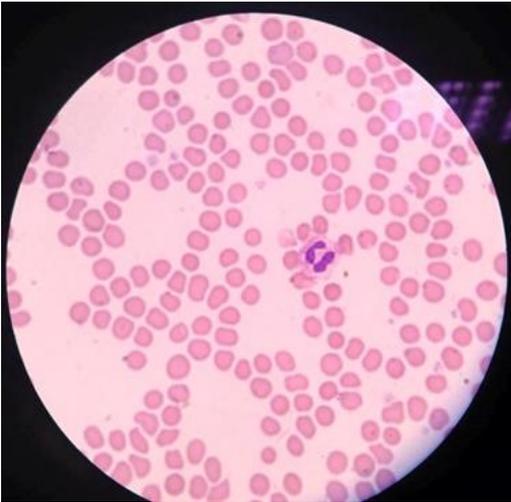


Ilustración 9: Neutrófilo raramente azurófilo

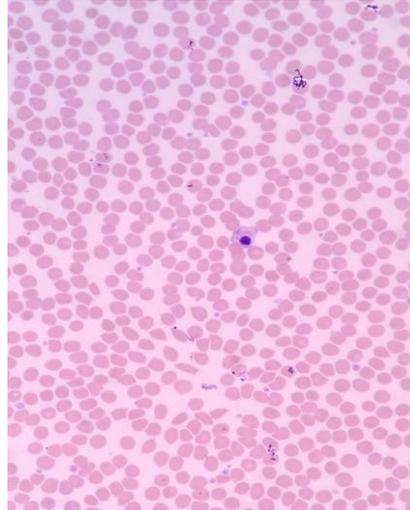


Ilustración 10: Eritoblastos basófilos.

- Ejemplo de células plasmáticas (**ilustración 11**) también llamadas plasmocitos y un ejemplo de hematíes nucleados y en forma alargada (**ilustración 12**)
 - a) Las células plasmáticas: son una variedad de leucocitos, es decir, de glóbulos blancos de la sangre, tienen la función de producir anticuerpos, proteínas que permiten neutralizar los virus, bacterias, parásitos.
 - b) Hematíes: también llamados glóbulos rojos, son las células sanguíneas que contienen en su interior la hemoglobina y son los principales portadores de oxígeno a las células y tejidos del cuerpo.

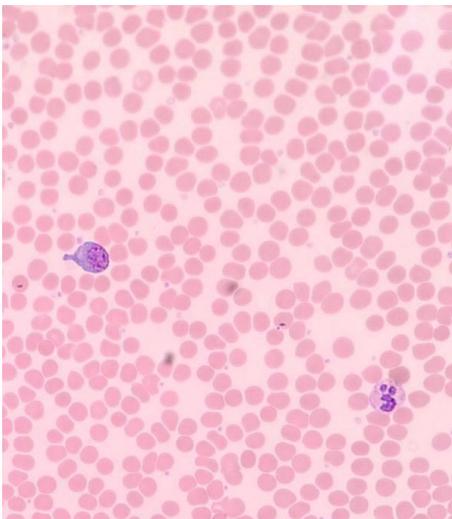


Ilustración 11: Célula plasmática

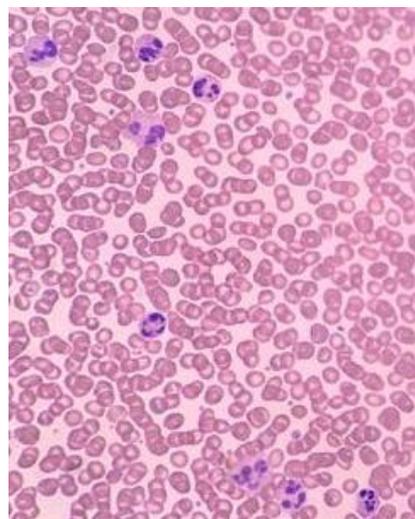


Ilustración 12: Hematíes nucleados

Técnicas realizadas

- Ejemplo del síndrome mieloproliferativo crónico (SLPC) (**ilustración 13**) que puede derivar en una leucemia mieloide crónica (LMC). En su citograma se observa gran cantidad de población en las áreas LUC (células grandes no teñidas.7
 - a) Los citogramas se construyen a partir de la citometría de flujo que se basa en la interacción de las células con un haz luminoso, esto genera una serie de señales que se recogen en unos detectores y son transformadas en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales.

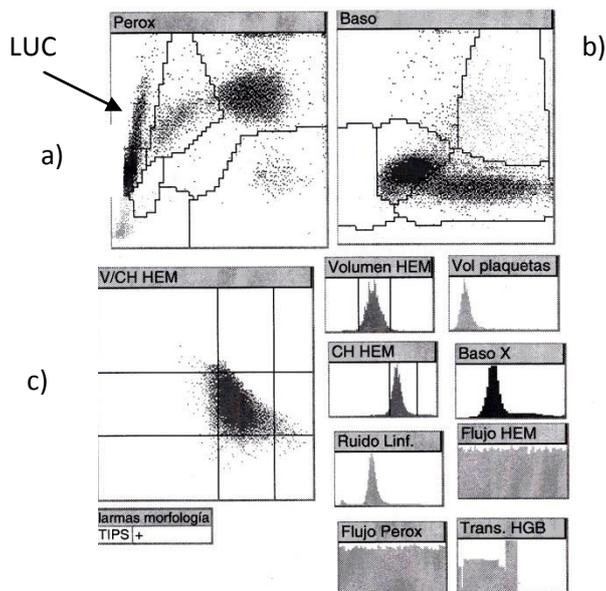
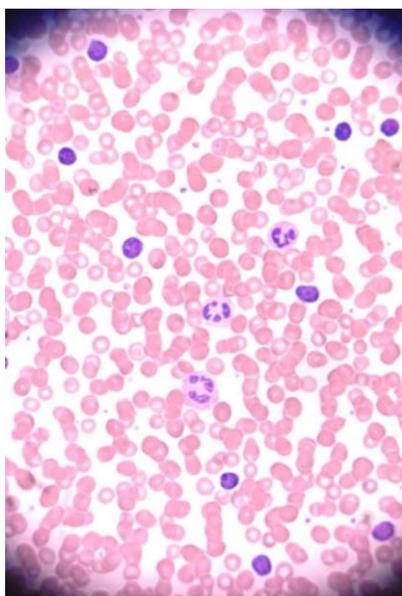


Ilustración 13: SLPC

Ilustración 14: Citograma de SLPC

- a- Datos de glóbulos blancos derivados del canal de Peroxidasa (Perox).
 - b- Datos de leucocitos derivados del canal de lobularidad de basófilos (Baso).
 - c- Datos del volumen y hemoglobina eritrocitaria.
- Ejemplo de Leucemia linfocítica crónica (LLC) (**ilustración 15**) mostrando linfocitos morados y de su citograma, en el que se observa una gran cantidad de población en las áreas LUC del citograma de peroxidasa y en las demás áreas del citograma de basolobularidad, en el que se distinguen una amplia población de células mononucleadas que invaden la zona de basófilos.

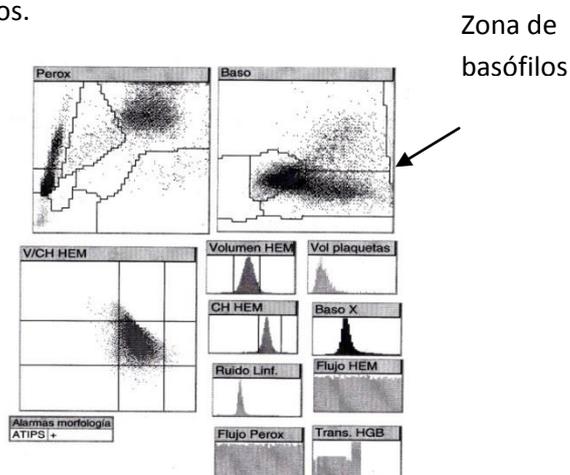
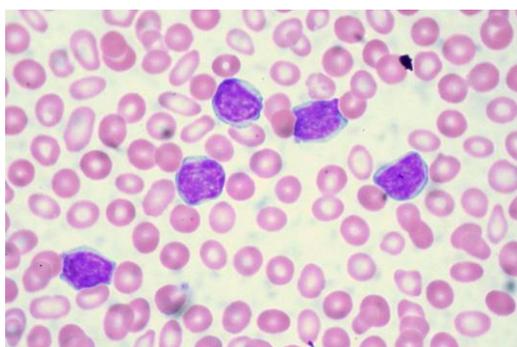


Ilustración 15: LLC

Ilustración 16: Citograma LLC

Técnicas realizadas

En ambos citogramas (**ilustración 14 y 16**) se detectan células precursoras o blastos, que se localizan en las áreas mencionadas, con gran densidad de población celular.

Discusión

Los resultados hematológicos aportan mucha información sobre posibles patologías, sobre alguno de sus parámetros analíticos y también puede indicarnos la existencia de alguna enfermedad concreta. En el caso de las leucemias se ha descrito que tanto las leucemias agudas como las crónicas presentan anemia y trombocipenia. Las leucemias se caracterizan por la presencia de abundantes células precursoras o blastos en sangre periférica.

2.3 Servicio de Cromatografía

Se basa en el diagnóstico de enfermedades renales congénitas y adquiridas y también en el tratamiento precoz de la hipertensión arterial y de la diabetes.

2.3.1 Técnica de Inmunodifusión Radial

La Inmunodifusión Radial se basa en la reacción de precipitación descrita por Ouchterlony, siendo una de las primeras reacciones antígeno-anticuerpo documentadas.⁴ La técnica se lleva a cabo, en medio sólido, como el agar, que permite la difusión de las moléculas proteicas. En este gel, el suero problema se disuelve, homogéneamente y el antígeno se coloca en un pocillo en el centro del gel. El antígeno se desplaza por el gel, siendo fijados por los anticuerpos; al principio, estos complejos antígeno-anticuerpo son solubles y siguen difundiendo hasta que se unen a una cantidad de anticuerpo necesaria para precipitar, formando un anillo alrededor del pocillo.⁵ Sin embargo, es un método lento y laborioso ya que se analiza un número determinado de muestras y es de baja sensibilidad.⁶

Material y método

Se cuantifica la alfa-1-antitripsina (llamada a partir de ahora a α_1 -AT) en deposiciones, usando placas de Inmunodifusión Radial (LC-Partigen), con el objetivo de establecer valores de referencia en muestras aisladas de heces.

a) Alfa-1-antitripsina.

La α_1 -AT es una glucoproteína de 52 KDa, constituida por una cadena de 394 aminoácidos y 3 cadenas laterales de hidratos de carbono. El gen que codifica la α_1 -AT se encuentra en los hepatocitos.⁷

La α_1 -AT es sintetizada por el hígado con un PM de 54000. Similar a la albúmina (PM 67000 Da). En comparación con esta, ni es degradable por las proteasas intestinales ni es reabsorbida, por lo que su análisis en heces establece un fiel marcador. Además de su capacidad inhibitoria de la tripsina⁸, es capaz de inhibir la mayoría de las serín proteasas (hidrolasas que degradan enlaces peptídicos y proteínas) de los neutrófilos, aunque su diana específica es la elastina del neutrófilo. Esto lleva a la ruptura de la pared alveolar neta y enfisema panacinar (destrucción uniforme de todo el saco de aire o alvéolos).

Técnicas realizadas

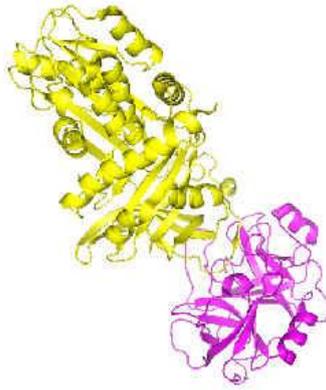


Ilustración 17: α_1 -AT (amarillo) ligada al sitio activo de la tripsina (rosa).

Posee 9 unidades de Metionina, lo que le confiere una importante capacidad antioxidante (ya que Cys y Met son aminoácidos con grupos $-SH$ y $-SR$, por tanto fácilmente oxidables y que actúan, sobre todo formando parte del Glutatión, como “tampón redox”) también es capaz de inhibir o enlentecer la replicación e infectividad del virus del SIDA y la de otros virus y bacterias. Todo esto indica que la α_1 -AT es una molécula antiinflamatoria natural de amplio espectro, cuya función sería modular las reacciones inflamatorias que se producen continuamente en el organismo.⁹

Los alimentos no presentan α_1 -AT a excepción de la leche materna, por esto no se considera la determinación de α_1 -AT un método apropiado en los lactantes amamantados, ya que la α_1 -AT se excreta en la leche humana sin seguridad de escape intestinal de proteínas.¹⁰

El gen de la α_1 -AT se trasmite por herencia mendeliana simple de manera autosómica codominante mediante 2 alelos, uno de cada progenitor, que se expresa independientemente en los hijos al 50%.

Enfermedades relacionadas con el déficit de la α_1 -AT

El déficit de α_1 -AT confiere una predisposición para desarrollar enfermedades a lo largo de la vida, principalmente enfisema pulmonar y diversos tipos de hepatopatías (incluidas colestasis neonatal, hepatitis juvenil, cirrosis hepática en niños y adultos y hepatocarcinoma), por lo que se debe considerar como una enfermedad sistémica¹¹ (son enfermedades que afectan a cualquier parte del cuerpo y a varios sistemas a la vez, incluidos múltiples órganos).

Procedimiento

Se marcan 8 tubos de ensayo y 8 vasos. Con un depresor de madera se coge 1/3 de la muestra y se rellena con H_2O destilada, proporción 1:2 ($V_{\text{heces}}: V_{H_2O}$) homogeneizar con Vortex.

Se cogen 2 ml del homogeneizado, se centrifugan los tubos y se dejan liofilizando hasta la mañana siguiente.

Al día siguiente se añade el volumen necesario de solución salina y se agitan en un Vortex posteriormente se llevan a un agitador rotatorio. Se preparan calibradores y controles. Una vez retirados los tubos del agitador rotatorio se centrifugan.

Técnicas realizadas

	V	V solución salina
Copa 2	25µl eppendorf	25µl
Copa 3	25µl Copa 2	25µl
Copa 4	10µl	390µl

Tabla 1: Tabla de Calibradores de la α_1 -AT

En la placa de inmunodifusión radia (LC-Partigen) se cargan 20µl de cada uno de los calibradores, controles y de las muestras. Se deja la placa en posición horizontal en una cámara húmeda durante dos días. Pasadas las 48h se leen los diámetros con una lupa (ilustración 18).

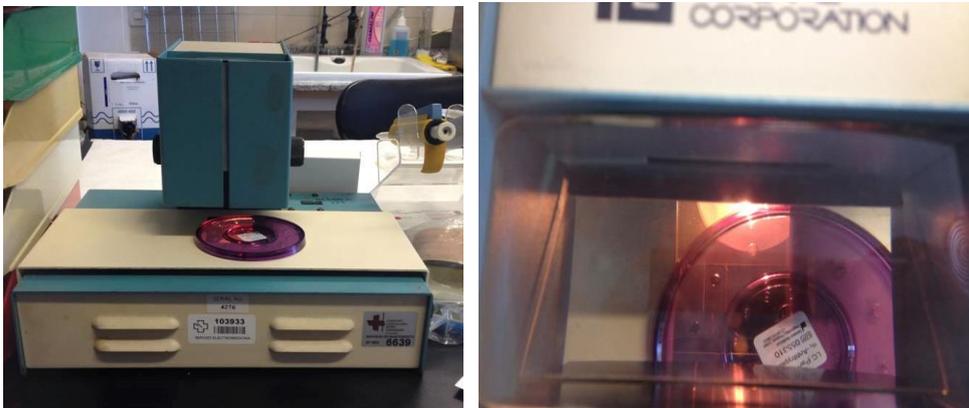


Ilustración 18: Ejemplo de placa de Inmunodifusión Radial.

Resultados

Los niveles de α_1 -AT por debajo de lo normal pueden estar asociados a cirrosis, enfisema, tumores hepáticos, hipertensión portal y con el síndrome de distrés respiratorio neonatal. Los valores más altos de lo normal de α_1 -AT significará la existencia de inflamaciones agudas y crónicas, en infecciones y en ciertos cánceres.

Valores normales < 2.20 mg/dL

Pocillo	Dilución	d (mm)	d2 (mm ²)	C (mg/dL)
0	0	4,1	13,20	0,00
1	1	8,3	54,11	6,00
2	2	6,5	33,18	3,00
3	4	5,6	24,63	1,60
4	Control	7,5	44,18	4,55
5	Tubo 1	7,9	49,02	5,27
6	Tubo 2	6,7	35,26	3,23
7	Tubo 3	6,2	30,19	2,48
8	Tubo 4	9,8	75,43	9,19
9	Tubo 5	5,7	25,52	1,78
10	Tubo 6	6,6	34,21	3,07

Tabla 2: Tabla del ensayo de la α_1 -AT para un conjunto de pacientes reales.

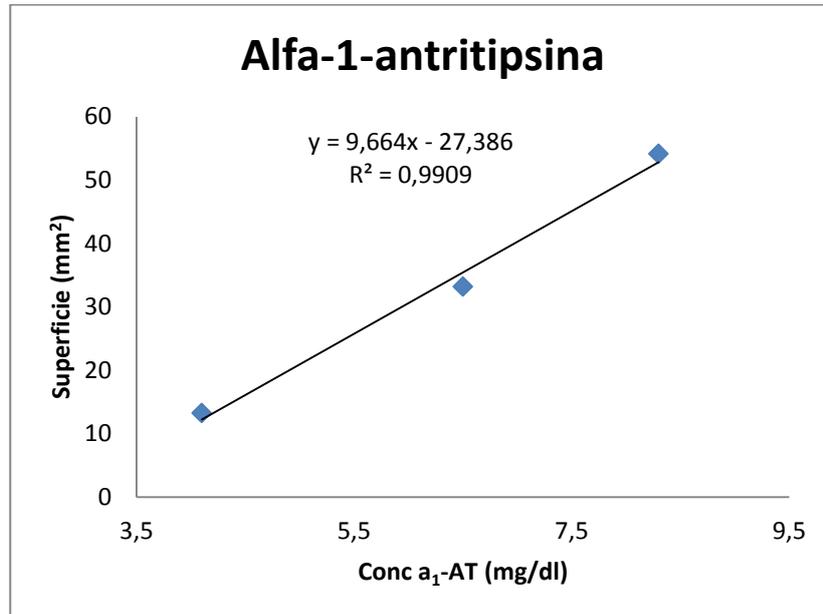


Ilustración 19: Gráfica de la α_1 -AT para un conjunto de pacientes reales

Los pacientes correspondientes a los tubos 4 y 5 son los que más preocupan ya que el 4 presenta una concentración elevada y el 5 presenta una concentración más baja de lo normal frente al resto, esto puede significar la existencia de inflamaciones agudas y crónicas en infecciones.

2.3.2 Disacaridasas

Las disacaridasas son enzimas que rompen los disacáridos en las unidades de monosacáridos que la originan, como parte de la etapa de digestión.

En las personas con un déficit de disacaridasa no se observará alteración en la absorción de los monosacáridos, pero si se produce alteración en la mucosa, sí que afecta a su absorción. La prueba más utilizada para determinar el déficit de disacaridasa es la medición del contenido catalítico de la enzima que se corresponde a un espécimen que procede de una biopsia yeyunal.¹²

En la deficiencia de las disacaridasas, los azúcares no absorbidos llegan al intestino distal, lugar donde las bacterias lo descomponen en ácido láctico y otros ácidos. Esto puede provocar diarrea. En ocasiones la exclusión de leche en los individuos puede hacer desaparecer la diarrea.

Otros enzimas disacaridasas son la maltasa, lactasa y sacarasa. La glucosa corresponde al 80% de los productos de degradación de los hidratos de carbono y se absorben de acuerdo a un mecanismo de transporte activo que será en función del sodio. La galactosa comparte los mismos transportadores de glucosa. La fructosa se absorbe en un proceso de transporte facilitado pasivo. La deficiencia congénita de alguna de estas disacaridasas provoca una mala

Técnicas realizadas

absorción de los azúcares, y esto a su vez provoca diarrea. Los azúcares se absorben en el duodeno y mitad proximal del yeyuno.¹³

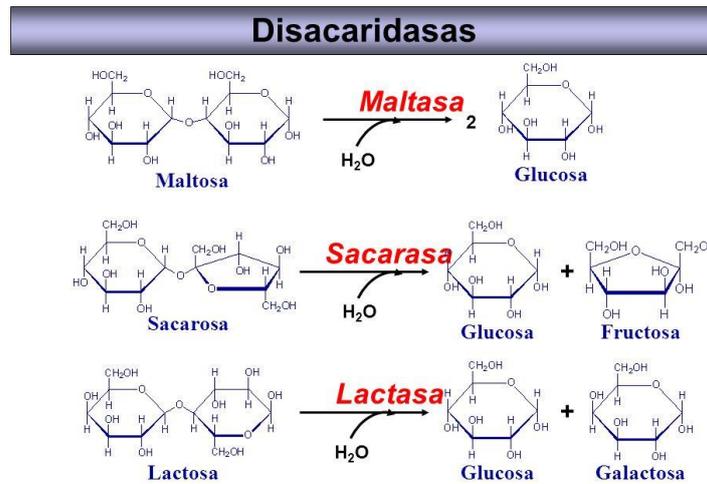


Ilustración 20: Las diferentes disacaridasas.

Material y método

Caracterización cinética de la Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina (en adelante FA) es un enzima (presente en la membrana celular) que cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo fosfato y un radical orgánico a pH básico, lo que libera fosfato en el medio y en presencia de iones Zn^{+2} y Mg^{+2} . Se inhiben con Be^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} y varios polianiones.

Si las medidas de fosfatasa alcalina son anormales indica posible existencia de enfermedades óseas degenerativas o bien daños hepáticos.¹⁴

La cinética enzimática se basa en el estudio de la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas y las causas de que sea su variación.

Su lectura se lleva a cabo en un espectrofotómetro de marca CINTRA 10 (680 nm).

Fundamento del espectrofotómetro

Este es un espectrofotómetro de UV-VIS se basa en la absorción de radiación electromagnética por dependencia lineal entre la cantidad de radiación absorbida y la concentración. Se selecciona la longitud de onda de luz (680 nm) que atraviesa la disolución y se mide la cantidad de luz absorbida por la misma.

Técnicas realizadas



Ilustración 21: Espectrofotómetro UV-VIS de marca CINTRA 10 para la determinación de FA.

Procedimiento

Los puntos de la curva de calibración se han de preparar a partir de la solución SM2 (estándar 2). Mediante dilución con H₂O acidulada (por cada 100 ml de H₂O destilada una gota de HCl 6 M).

Curva de calibración.

F-0 (Cal 0): 500 µL de H₂O acid.

F-1: 475 µL de H₂O acid + 25 µL de SM2.

F-2: 450 µL de H₂O acid + 50 µL de SM2.

F-3: 400 µL de H₂O acid +100 µL de SM2.

F-4: 250 µL de H₂O acid+ 250 µL de SM2.

F-5: 500 ml de SM2.

Controles externos: PP/PN, Q1/Q2 (enteros, sin diluir)

Estándares (F0-F5) por duplicado: 1200 µL de Reactivo 1 + 40 µL de cada calibrador

Diluciones biopsia (por duplicado) + controles externos: 40 µL diluciones H 1:5 biopsias PN/PP, Q1/Q2 (enteros) + 100 µL reactivo 1 (mezclar) + 100 µL reactivo 2 (mezclar) y se lleva a cabo su lectura.

Resultados

Los valores normales de fosfatasa alcalina pueden variar en función de la edad, sexo, etc. Los niveles altos de FA normalmente se observan en niños que presentan un aumento repentino en su crecimiento y en las mujeres embarazadas. Los niveles de FA superiores a los normales pueden deberse a: obstrucción biliar, afecciones óseas, hepatitis, leucemia, linfoma, etc. En cambio los niveles de FA inferiores a los normales pueden deberse a: desnutrición, enfermedad de Wilson, hipofosfatasa, etc.

Técnicas realizadas

Valores normales:

- Adultos: de 25-100 U/L (unidades por litro)
- Niños: menos de 350 U/L

	Qtest	ABS-1	ABS-2	ABS MED	ABSM-F0
F-0	0	0.1574	0.1967	0.1771	0
F-1	0.0020	0.1965	0.2090	0.2028	0.0257
F-2	0.0040	0.2010	0.2320	0.2165	0.0395
F-3	0.0080	0.2284	0.3005	0.2645	0.0874
F-4	0.0200	0.3629	0.4443	0.4036	0.2266
F-5	0.0400	0.5435	0.6308	0.5872	0.4101
PN	0.0019	0.0200	0.0263	0.0232	
PP	0.0058	0.0685	0.0601	0.0643	
Q-1	0.0005	0.0098	0.0078	0.0088	
Q-2	0.0016	0.0189	0.0228	0.0208	
Pac 1	0.0020	0.0250	0.0241	0.0246	

Tabla 3: Tabla del ensayo de la FA para un paciente real

Se realiza cinética química con un espectrofotómetro que se encarga del estudio de la rapidez de reacción, como cambia la rapidez de reacción bajo condiciones variables. ABS-1 es la absorbancia al principio de la reacción y la ABS-2 es pasados 3 min.

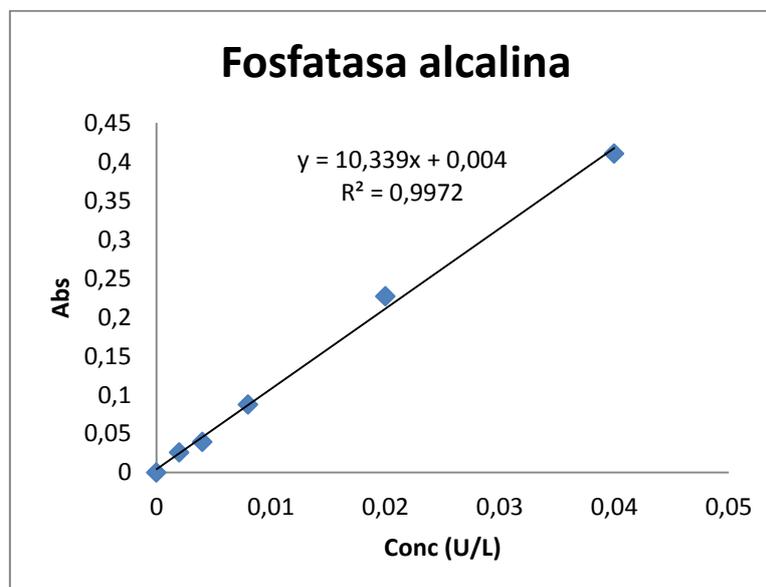


Ilustración 22: Gráfico del ensayo de la FA para un paciente real

2.3.3 Mucopolisacáridos (GAGs)

Los mucopolisacáridos son cadenas largas de moléculas de azúcar, se encuentran en todo el cuerpo, con frecuencia en el moco y en el líquido alrededor de las articulaciones, comúnmente denominados glucosaminoglucanos y son polisacáridos heterogéneos lineales que están formados por la condensación de un gran número de unidades disacáridas, constituidas a su vez por una molécula de hexosamina (N-acetil-glucosamina) que puede estar sulfatada y un ácido urónico en la mayoría de los casos ácido glucurónico.¹⁵

Técnicas realizadas

Constituyen un grupo de enfermedades de causa monogénica (producidas por alteraciones en la secuencia de DN de un solo gen) que se caracteriza por la acumulación excesiva de sulfato de glucosaminoglicon en diversos tejidos y órganos.

Cuando hay deficiencia de enzimas necesarias para la descomposición de mucopolisacáridos, estos se acumulan de forma inmadura de manera que no pueden ser eliminadas ni utilizadas de forma correcta por el organismo, esto se denomina mucopolisacaridosis (llamada MPS en adelante) ¹⁶ que son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas que se enmarcan dentro de las enfermedades originadas por el cúmulo excesivo de sustancias. La MPS tiene un patrón de herencia reversible (hereda dos genes defectuosos, uno de cada padre). Una excepción es la enfermedad de Hunter, ya que su patrón de herencia es diferente (ligado al cromosoma X), por tanto se trasmite a través de vía materna a sus hijos varones.

Material y método

Para el análisis de los mucopolisacáridos se requiere una muestra de orina del paciente, carbazone al 0.125% en etanol absoluto y tetraborato de sodio en sulfúrico concentrado al 0.025 M. La lectura de la determinación de la concentración de mucopolisacáridos se lleva a cabo en el espectrofotómetro de marca CINTRA 10 (**ilustración 21**) (explicación del espectrofotómetro pg 23)

Procedimiento

Esta técnica requiere 3 días de trabajo:

1º día:

Se añade 100 mg de CPC (cetilpiridinio) y 10 mL de agua (si solo mandan un tubo de orina hacer en análisis cuantitativo, si mandan 35 ml hacer también el cualitativo).

Se centrifugan los tubos y se añade 0.2 mL de CPC, se mete en la nevera en hielo picado (durante 1 día).

2º día:

Se ha de meter el tubo en un baño a 37°C para disolver los uratos, se centrifuga y se aspira el sobrenadante, se añade 5 mL de etanol absoluto con acetato potásico (KOAC 10%). Se deja en hielo picado hasta el día siguiente.

3º día:

Se centrifugan los tubos, se desecha el sobrenadante y se añade 1 mL de dietil éter, y se vuelve a desechar el contenido de los tubos.

Curva de calibración.

BP (Blanco) 1mL agua

ST1 (Estándar 1) 0.2 mL SM2 y 0.8 mL agua

ST2 0.4 mL SM2 y 0.6 mL agua

Técnicas realizadas

ST3 0.6 mL SM2 y 0.4 mL agua

ST4 0.8 mL SM2 y 0.2 mL agua

ST5 1 mL SM2

0.2 mL de STC (entándar), CC (controles) y muestra, 0.2 mL de carbazole y 2 mL de tetraborato de sodio a cada uno de los tubos.

Se agitan observándose un color azulado.

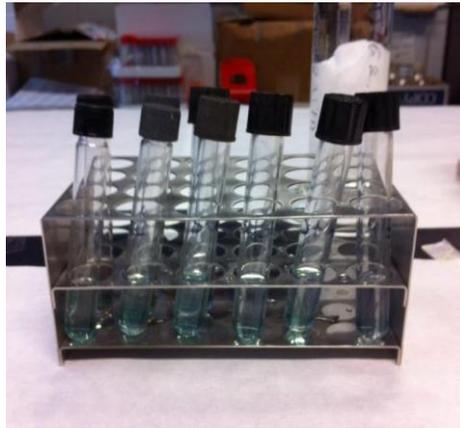


Ilustración 23: Curva de calibración antes de introducirlo en el baño de agua

Se meten los tubos en un baño de agua a 100°C durante 10 min o más observando que los tubos adquieren color rosado.



Ilustración 24: Curva de calibración después de introducirlo en un baño de agua a 100°C.

Se lee su absorbancia a 530 nm en el espectrofotómetro de marca CINTRA 10 esta lectura se realiza rápidamente para evitar su degradación (**ilustración 21**).

Técnicas realizadas

Resultados

Es importante tener presente que la excreción de mucopolisacáridos en orina varía en función inversa con la edad del niño, siendo mayor durante los primeros años de vida y disminuyendo hasta estabilizarse prácticamente a los 9 años:

	Valores (mg/mmol crea)	Edad
Cribado de glucosaminoglucanos	0.8-22.79	0-6 meses
Cribado de glucosaminoglucanos	0.56-15.09	6 meses- 1 año
Cribado de glucosaminoglucanos	0.65-12.44	1-2 años
Cribado de glucosaminoglucanos	0.27-9.35	2-6 años
Cribado de glucosaminoglucanos	0.26-7.07	6-10 años
Cribado de glucosaminoglucanos	0.13-4.5	10-15 años
Cribado de glucosaminoglucanos	0.36-2.69	15-20 años
Cribado de glucosaminoglucanos	0.23-174	>20 años

Tabla 4: Valores de referencia de mucopolisacáridos.

En nuestro ensayo, el paciente tiene una edad de 15 años. Como se observa en la tabla los valores de referencia normales para niños entre 15-20 años son entre 0.36 y 2.69 mg/mmol creatinina.

	Conc	Abs	Resultados	Cálculos (mg/g crea)	Cálculos (mg/mmol crea)
Bp	0	0			
ST1	10	0.0654			
ST2	20	0.1263			
ST3	30	0.2429			
ST4	40	0.2973			
ST5	50	0.4196			
C		0.1818	20.725		
M		0.4059	48.7375	7.08909	0.80557
Crep		0.9052	111.025		

Tabla 5: Tabla del ensayo de mucopolisacáridos para un paciente real.

Técnicas realizadas

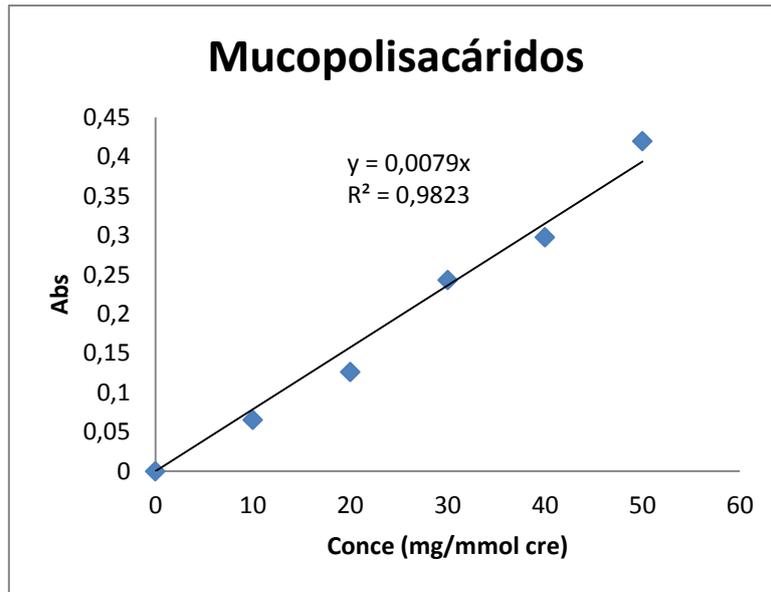


Ilustración 25: Curva de calibración de mucopolisacáridos.

Valor de creatinina: 133 mg/dL (verifica el estado de la función renal)

Se observa que este paciente presenta un valor normal de mucopolisacáridos pues su valor es aproximadamente 0.8 mg/mmol crea, por tanto, se encuentra dentro de los límites.

2.3.4 Porfirina

La porfirina existen en la naturaleza como parte de tres grupos de compuestos: clorofila, vitamina B12 (cobalamina) y heme, cada uno está formado por un tetrapirrol, la estructura es muy similar solo se diferencia porque cada una de ellas está unida a un metal diferente, la clorofila contiene magnesio, la cobalamina cobalto y el heme hierro.¹⁷

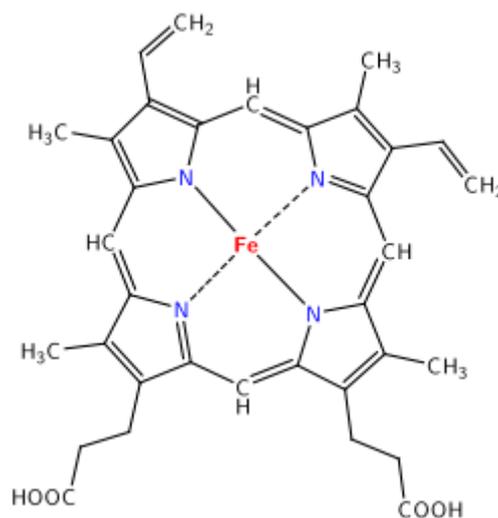


Ilustración 26: Estructura de la porfirina

La clorofila se forma con la reducción de una de las unidades de pirrol en el anillo de porfirina, la vitamina B12 es necesaria para la maduración de los eritrocitos y el heme es utilizado por los

Técnicas realizadas

precursores de los eritrocitos como un grupo prostético de la hemoglobina y en los hepatocitos.

Las porfirias son enfermedades metabólicas causadas por un déficit en las enzimas que intervienen en la biosíntesis del grupo hemo.¹⁸ En condiciones normales no aparece porfirina en la orina, o solo en concentraciones muy bajas. Cuando ocurre un trastorno en la biosíntesis del hemo, en la orina se encuentran concentraciones elevadas de alguno de los compuestos intermedios. Este cuadro clínico recibe el nombre de porfiria. Existen 7 tipos de porfirina distintas en función del punto en el que se modifique la cadena enzimática (**tabla 6**).

Enfermedad	Trastorno enzimático	Desarrollo
Porfiria ALA-D	Porfobilinógeno-sintasa	Agudo
Porfiria aguda intermitente	Uroporfirinógeno-sintasa	Agudo
Porfiria eritropoyénica congénica (enfermedad de Günther)	Uroporfirinógeno-cosintasa	
Porfiria cutánea tarda	Uroporfirinógeno-descarboxilasa	Crónico
Coproporfiria hereditaria	Coproporfirinógeno-oxidasa	Agudo
Porfiria variegata	Protoporfirinógeno-oxidasa	Agudo
Protoporfiria	Ferroquelatasa	

Tabla 6: Porphirinas hereditarias primarias.

La porfirinas Uro y Copro son intermediarios normales en la biosíntesis del heme. Las alteraciones en el heme pueden afectar a la médula ósea o al hígado.

También se pueden producir porfirias debido a factores externos, por ejemplo, el alcohol, tóxicos ambientales, etc. En este caso se habla de porfirias secundarias. La frecuencia de estas enfermedades es muy baja oscila entre 1:25000 (porfiria cutánea tarda) y en muy pocos casos (enfermedad de Günther). Su presencia también es en función de la región.¹⁹

Algunos de los síntomas de estas enfermedades son lesiones cutáneas, cólicos, trastornos cardiovasculares y síntomas neurológicos, en función del tejido implicado se diferencian en porfirias hepáticas y eritropoyénicas. Las hepáticas afectan al hígado y pueden ser agudas o crónicas y las eritropoyénicas, a los glóbulos rojos y a la médula y es la enfermedad de Günther.

Las porfirias agudas se presentan en forma de ataques y las crónicas no se presentan en forma de ataque y se presentan en síntomas cutáneos. Las porfirinas se pueden eliminar en la orina, sangre y deposiciones aunque su eliminación es en función de cada una de ellas.

Material y método

Para el análisis de la porfirina se requiere de un sistema de gradiente binario, de alta o de baja precisión, con 2 bombas de HPLC, inyector y detector fluorescente. Se usa un horno de columnas termostatzado para evitar fluctuaciones en la temperatura.

Técnicas realizadas

Fundamento del HPLC con un detector fluorescente

El instrumento con el que se lleva a cabo la HPLC consiste en un depósito de solvente, un degasificador (bomba), un inyector, un detector, un integrador y una columna. La columna es un horno de control de temperatura

Los detectores de fluorescencia para HPLC son los detectores más sensibles y son semejantes en diseño a los fluorímetros y espectrofluorímetros. En la mayoría de ellos la fluorescencia se detecta por medio de un fotodetector colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación y solo se pueden detectar aquellos compuestos que tengan fluorescencia nativa o inducida por derivatización.

Las condiciones del experimento cromatográfico son: flujo 1.2mL/min, temperatura 20°C, el tiempo unos 20 min y la fase móvil metanol-agua.



Ilustración 27: HPLC para las porfirinas

Procedimiento

En un tubo de microcentrífuga de color topacio (ámbar) de 1.5mL se ha de añadir: 500µL orina, 50µL de estabilizador y 50µL de solución de cebado se mezclan y se dejan en reposo, después se ha de añadir 50µL de estándar interno, se mezclan y se centrifuga durante 10 min. Se coge 50 µL del sobrenadante y se pasa a un microvial. La preparación de los controles se hace del siguiente modo:

- Control alto (HC): reconstruir un vial de calibrador con 1mL de agua.
- Control bajo (LC): calibrador diluido a la mitad. 250+ 250 µL (cal+ agua o suero salino).

Su análisis se hace por HPLC.

Técnicas realizadas

Resultados

La uroporfirina y la coproporfirina son los productos de oxidación de sus respectivos porfirinógenos, que son los verdaderos sustratos en la vía biosintética.

Valores normales:

Uro-PF: < 21 µg/L

Copro-II: < 16 µg/L

Copro III: < 50µg/L

Número de pico	Tiempo de retención (min)	Nombre de pico	Altura	Conc (µg/l)
1	6.75	Uro PF	6812	166.5*
3	8.69	IS1	10814	-
6	11.87	Copro II	423	4.9
7	12.43	Copro III	765	9.9

Tabla 7: Tabla del ensayo de Porphirinas para un paciente real.

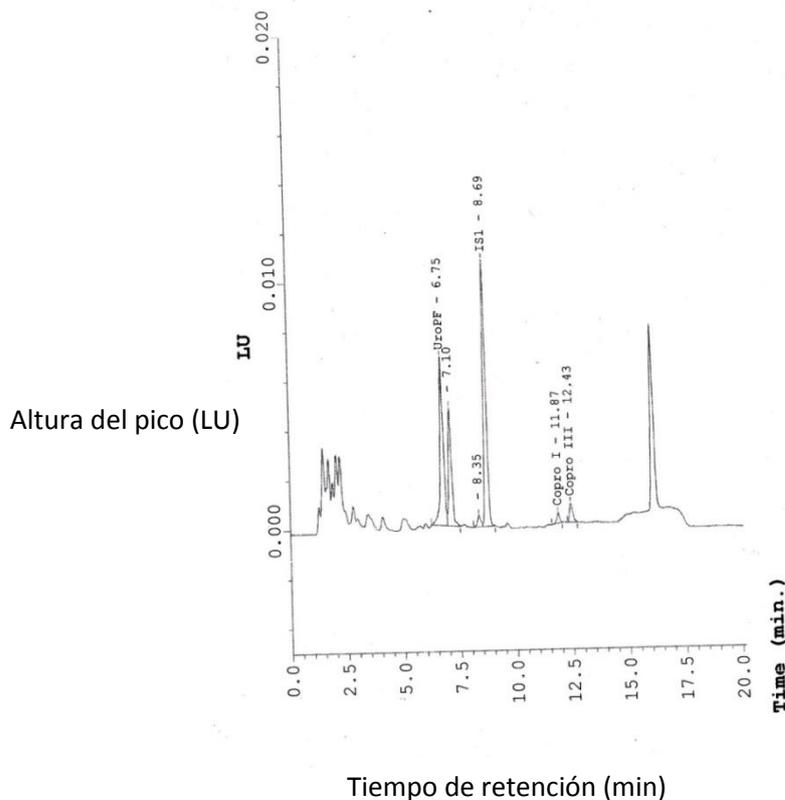


Ilustración 28: Gráfica del ensayo de las porfirinas para un paciente real.

En este paciente se observan valores anormales de uroporfirina pudiendo ser signo de: protoporfiria.

Técnicas realizadas

Los precursores de las porfirinas son el ácido 5-aminolevulínico (ALA) y el porfobilinógeno (PBG).

a) Ácido 5-Aminolevulínico (ALA)/Porfobilinógeno (PBG)

ALA y PGB son neurotóxicos y se excretan desde el hígado tras inducción de la síntesis del grupo hemo. El diagnóstico se confirma por una elevada concentración en orina de ALA y PBG y de las porfirinas totales, en la mayor parte de los casos el defecto enzimático se encuentra tanto en los eritrocitos como en otras células, como los hepatocitos, pero en algunos casos la PBG-D puede ser normal en los eritrocitos y deficitaria en otras células.²⁰

ALA es un enzima característico en la secuencia bioquímica y es un precursor natural del grupo hemo que se metaboliza mediante una serie de reacciones enzimáticas a porfirinas fluorescentes y es característica la elevación de este enzima «inducible»²¹ en síndromes porfirínicos primarios y en la porfirinuria secundaria a hepatopatías. PBG es un precursor monopirrólico de las porfirinas, es importante señalar que el porfobilinógeno posee dos radicales ácidos, uno de ácido acético y otro de ácido propiónico

Material y método

La muestra se pasa a través de dos columnas de manera consecutiva que contienen resinas de intercambio iónico; la primera retiene el PBG mientras que la segunda retiene el ALA. Una vez que se eliminan las interferencias por lavado, se eluye tanto ALA como PBG y se determinan espectrofotométricamente, en función de la absorbancia a 555nm del producto de la reacción de Elrich.²²

Procedimiento

Separación cromatográfica

Se toma una microcolumna de PBG y una microcolumna de ALA por muestra, se destapan y se deje pasar todo el sobrenadante desechando los eluidos. Se ha de colocar la columna de PBG sobre la de ALA.



Ilustración 29: Microcolumnas de ALA y PBG.

Técnicas realizadas

Se pipetea sobre la columna superior (PBG): agua destilada (10mL), muestra (1mL) y agua destilada (20mL) y se desecha el eluido y se separa la columna superior (PBG) y se guarda en la oscuridad para cuantificarla posteriormente.

Determinación del ALA

Sobre la columna de ALA se pipetean 10mL del reactivo, se recoge el eluido y se pipetea en una serie de tubos:

	Blanco	Patrón	Muestra
	-	-	Eluido
Patrón de ALA (S)	-	0.1 mL	-
Reactivo (1)	10 mL	9.9 mL	-
Reactivo (A)	0.2 mL	0.2 mL	0.2 mL

Tabla 8: Volúmenes pipeteados.

Se agita y se incuba durante 10 min en un baño de agua hirviendo (100 °C), se pipetea 1 mL de los tubos incubados y 1 mL del reactivo de Ehrlich (**ilustración 30**)

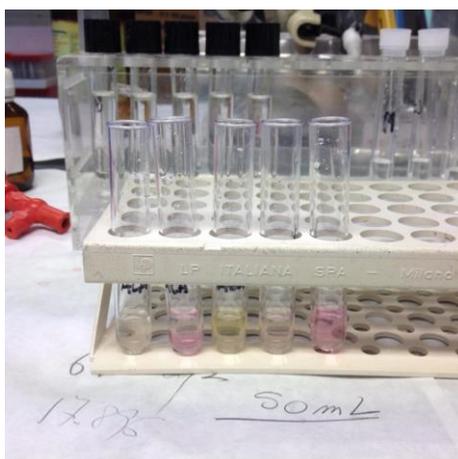


Ilustración 30: Blanco, controles y muestra de ALA tras añadir 1 ml del reactivo de Ehrlich

Se lee la absorbancia (en un espectrofotómetro UV-VIS CINTRA 10) de la muestra y del patrón frente al blanco a 555nm (**ilustración 21**)

Determinación de PBG

Se coloca la columna de PBG sobre un tubo y se pipetean 4 mL del reactivo y se recoge el eluido, se agita bien y se pipetean en una serie de tubos:

	Blanco	Muestra
Eluido	-	1 mL
Agua destilada	1 mL	-
Reactivo de Ehrlich	1 mL	1 mL

Tabla 9: Volúmenes pipeteados.

Técnicas realizadas

Se lee la absorbancia (A) de la muestra frente al blanco a 555nm (**ilustración 21**)

Resultados

Valores normales:

- ALA (mg/24h): 1.5-7.5
- PBG (mg/24h): 0-3.4

	ALA	PBG
Blanco	0	0
ST	0.4011	-
C1	0.1191	0.0021
C2	0.3395	0.0078
Muestra	0.0368	0.0010

Tabla 10: Resultados obtenidos del ALA y PBG para un paciente real.

Una vez realizados los cálculos obtenemos que la concentración de ALA del paciente es 5.85 mg/24h y de PBG 0.104 mg/24h, estando ambos valores dentro del rango normal, por lo que, debemos descartar una porfiria primaria.

2.3.5 Vitamina A/E por HPLC

Las vitaminas A y E son liposolubles y se almacenan en mayor lugar en el hígado y en el tejido graso del cuerpo humano. En contra posición a otras vitaminas solubles en el agua, la dosis alta de vitaminas liposolubles puede llegar a ser tóxica.

La vitamina A se considera Trans-retinol, alcohol compuesto por cinco residuos isoprénicos, los dos terminales se condensan en un anillo de β -ionona, la forma más importante de vitamina A desde el punto de vista biológico son el aldehído y el ácido de retinol, también se denomina retinal o ácido retinoico.²³

El ser humano es capaz de metabolizar el retinal de los carotenoides (provitamina A), el cual, se reduce a retinol, sin embargo, no puede sintetizar un anillo de β -ionona.

Alguna de las funciones que se atribuyen a la vitamina A son: regulación de la reproducción y del crecimiento, regulación de la biosíntesis de glicoproteínas, síntesis de hormonas esteroideas, etc.

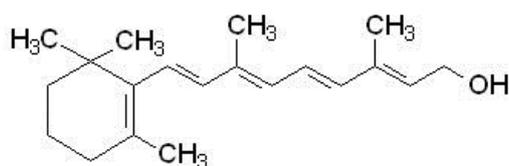


Ilustración 31: Estructura de la vitamina A

En caso de deficiencia de vitamina A, pueden aparecer algunos síntomas clínicos: mayor tolerancia a la sensibilidad luminosa, poca adaptación a la oscuridad, degeneración total en la retina, problemas en la reproducción y en el crecimiento óseo.

Técnicas realizadas

Procedimiento

Para el análisis de vitamina A/E se han de preparar varios calibradores, controles y un estándar interno:

- Calibrador: se añade 1 mL de agua destilada al CAL y se agita.
- Control: se añade 1 mL al control 1 y 2.
- Estándar interno: 20 a 60 mg de estándar interno, por cada mg de estándar interno se añaden 100 µL de REAG 1 y se agita suavemente.
Solución de trabajo: 10 µL de esta solución y 10 mL de REAG 1 y se mezclan.
- Muestras: para cada control, CAL y SAMP 200 µL de la muestra de suero y 400 µL de la solución de trabajo del estándar interno, se mezcla y se centrifuga el precipitado, después se añade 20 µL del sobrenadante en un vial.
Finalmente se hace análisis por HPLC.

Resultados

Los valores normales: fluctúan entre 50-200 µg/dl.

Número de pico	Tiempo de retención (min)	Nombre de pico	Altura	Conc (µg/dL)	Límite inferior (µg/dL)	Límite superior (µg/dL)
1	1.50	Vit A	196340	87.9	50.7	84.5
2	2.35	IS1	166775			
3	5.21	Vit E	116169	2248.6*	1080	1800

Tabla 11: Tabla del ensayo de la Vitamina A/E para un paciente real

Técnicas realizadas

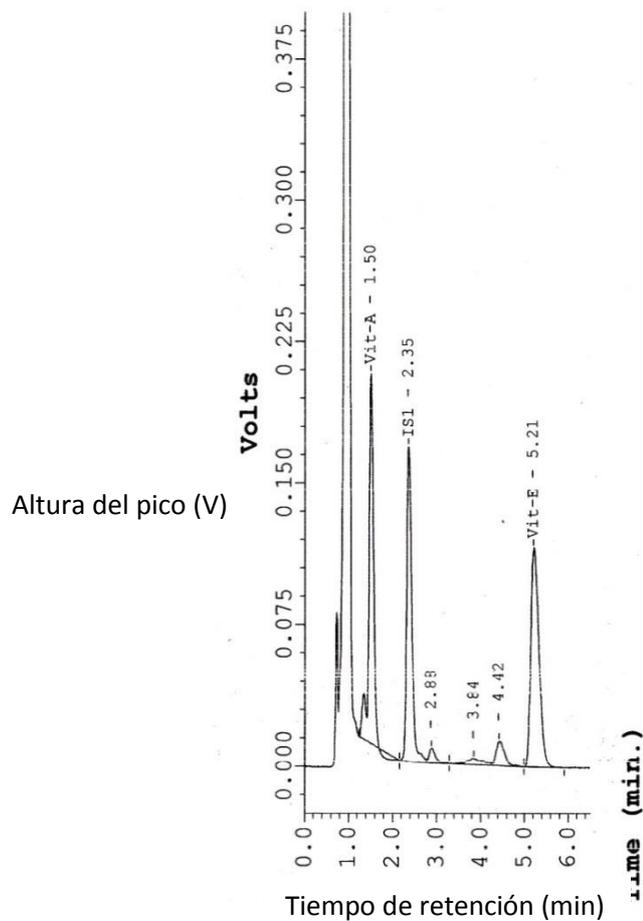


Ilustración 34: Gráfica del ensayo de la vitamina A y E para un paciente real

Se observan que este paciente presenta valores normales de vitamina A y valores muy altos de vitamina E. Los niveles altos de vitamina E puede aumentar el riesgo de defectos congénicos (defectos que ocurren cuando el bebé se está desarrollando en el cuerpo de la madre).

2.3.6 Análisis de la Clozapina en suero y plasma humano

La Clozapina es un medicamento utilizado para tratar algunas enfermedades mentales, también es conocida por el nombre de Clozaril, Clopine o Closyn.

La Clozapina suele ser recetada por los médicos a personas que presentan una enfermedad psicótica, por lo que se le conoce como medicamento antipsicótico.

Técnicas realizadas

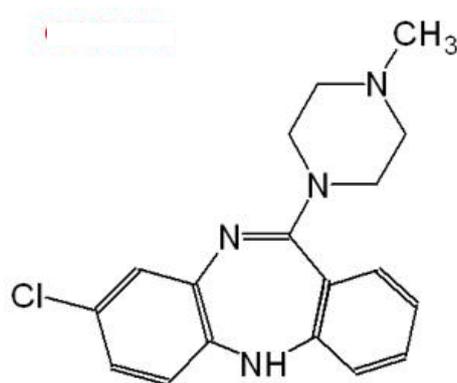


Ilustración 35: Estructura de la clozapina

Todas las drogas antipsicóticas efectivas típicas (las típicas son antiguas y se usan ampliamente como tratamiento de primera línea para las personas con esquizofrenia) y atípicas (las atípicas son nuevas y es un término ampliamente usado para describir algunos antipsicóticos que tienen una baja propensión a producir trastornos motores, sedación y elevación de la prolactina en suero) son bloqueadoras de los receptores D₂ de la dopamina en el sistema nervioso central. Estudios realizados con Tomografía de Emisión Positrónica (TEP; PET) (es una técnica no invasiva de diagnóstico e investigación "in vivo" por imagen capaz de medir la actividad metabólica del cuerpo humano) muestran una excelente correlación de la concentración de los medicamentos antipsicóticos en plasma con el bloqueo de receptores D₂, mejor generalmente que por dosificación. Algunos estudios demuestran que el bloqueo de más del 80% de los receptores provoca efectos secundarios en el sistema musculoesquelético, mientras que el bloqueo en un 60-80% de los receptores²⁴ conduce a una respuesta óptima. Por lo que resulta esencial el control terapéutico (TDM) de fármacos antipsicóticos.

Hoy en día se prefieren los antipsicóticos atípicos por sus menores efectos secundarios, ya que estas drogas están más débilmente ligadas a los receptores D₂.

Material y método

Los métodos analíticos para la determinación cuantitativa de estos antidepresivos deben ser muy sensibles y selectivos debido a que las concentraciones de plasma son muy bajas. La exactitud y la precisión de las concentraciones terapéuticas deben estar alrededor del 85%. Se utiliza una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (**ilustración 33**)

Condiciones del experimento cromatográfico: T^o 45°C, t 27min, bomba 1: 0.8mL/min, bomba 2: 1.3 mL/min, detector UV.

Procedimiento

Se añaden 600 µL de cada una de las muestras de plasma o suero y de los calibradores y controles a los viales y se centrifugan, se transfieren 500 µL del sobrenadante a un vial y se mezcla con 20 µL de estándar interno 1. Se ha de Inyectar 100 µL de la mezcla resultante y se lleva a cabo la lectura.

La fase móvil 2 (bomba 2) enriquece al analito sólo al principio del cartucho de extracción y elimina el resto de componentes de la matriz, así como componentes hidrófilos, del cartucho

Técnicas realizadas

de extracción. Al cabo de 6 min, el cartucho de extracción se conmuta en dirección de flujo inverso hacia el flujo de la fase móvil (bomba 1) y los analitos son eluidos desde el cartucho de extracción de fase inversa y seguidamente se separan en la columna analítica de fase inversa. La medición se lleva a cabo con un detector de UV.

Resultados

Es importante conocer los rangos terapéuticos, estos rangos son orientativos e identificativos de la población. Los valores pueden variar si se toman otros medicamentos, ya que la clozapina presenta una elevada variabilidad intra o interindividual.

	Rango terapéutico (ng/ml)
Norclozapina	50-180
Olanzapina	20-80
Quetiapina	100-500
Clozapina	350-600
Estándar interno	20-60

Tabla 12: Rangos terapéuticos

Número de pico	Tiempo de retención (min)	Nombre de pico	Altura	Conc (ng/mL)
1	10.81	Norclozapina	186118	316.88*
2	12.97	Olanzapina	9380	16.8*
3	15.02	Quetiapina	11971	25.6*
4	18.88	Clozapina	149245	444.3
5	23.23	Estándar interno	78861	---

Tabla 13: Tabla del ensayo de la Clozapina para un paciente real.

Técnicas realizadas

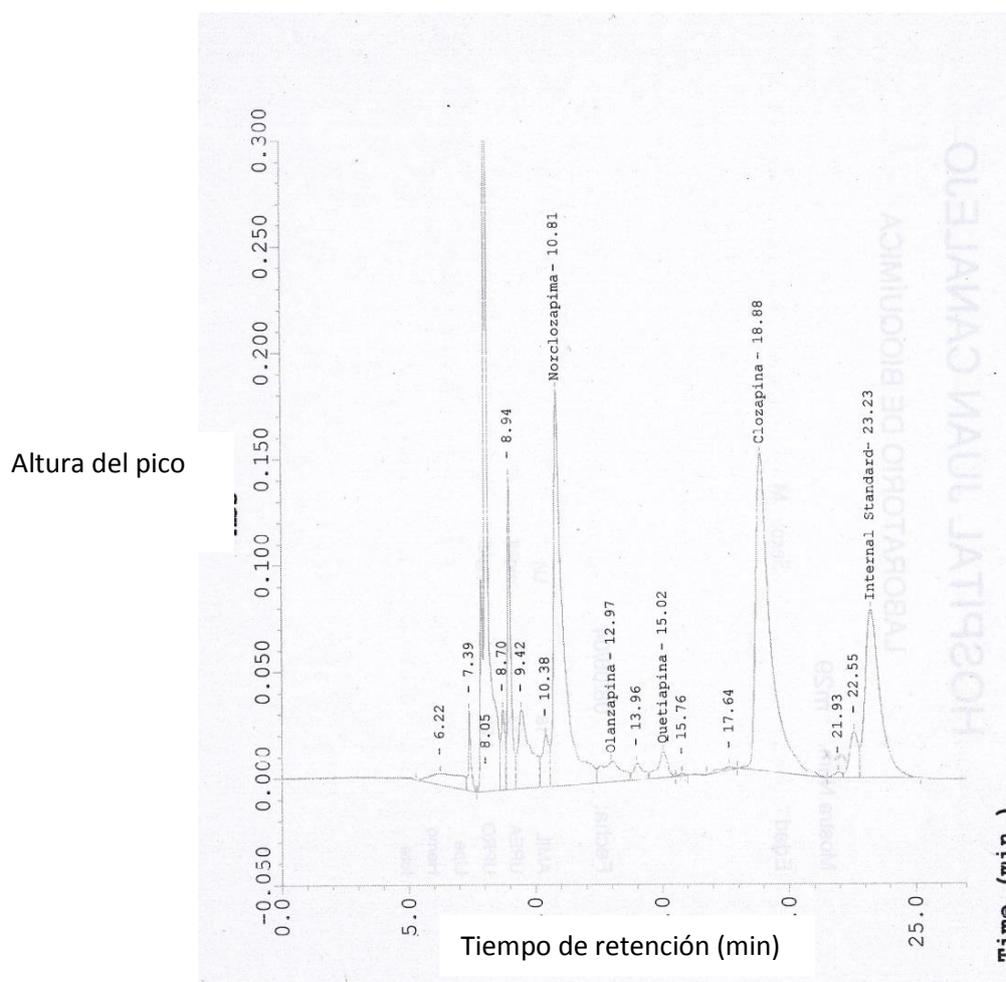


Ilustración 36: Gráfica del ensayo de la Clozapina para un paciente real.

Como se observa este paciente presenta cantidades muy altas de norclozapina en suero, pudiendo esto inducir en el paciente a comportamientos autodestructivos y ejercer un efecto totalmente indeseado, mientras que las concentraciones de clozapina en suero se encuentran dentro del rango terapéutico.

2.4 Sección de Hormonas

La sección de hormonas se dedican fundamentalmente a determinar sustancias endocrinas, marcadores tumorales, factores de crecimiento y mediadores celulares, utilizando técnicas como ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), RIA (*radio inmune assay*, radioinmunoensayo), o enzimoimmunoanálisis (EIA).

2.4.1 Técnica de radioinmunoensayo (RIA)

RIA es una técnica muy sensible en el ensayo in vitro utilizado para medir las concentraciones de antígenos mediante el uso de anticuerpos.

Se basa en la competencia que se establece, para unirse a anticuerpos específicos, entre la sustancia a cuantificar y cantidades conocidas de la misma sustancia, marcada con un isótopo radiactivo. Al producirse esta competición resulta que a mayor cantidad de sustancia a cuantificar, menor será la cantidad radiactiva que se une al anticuerpo y viceversa.

Técnicas realizadas

Este tipo de reacción aparece representado en la **ilustración 37**. Los resultados se observan al medir la radiactividad de la hormona marcada unida al anticuerpo y la de la hormona libre mediante un contador de centello. Al centrifugar, la hormona queda libre en solución, se une al anticuerpo y forma agregados fácilmente precipitables.

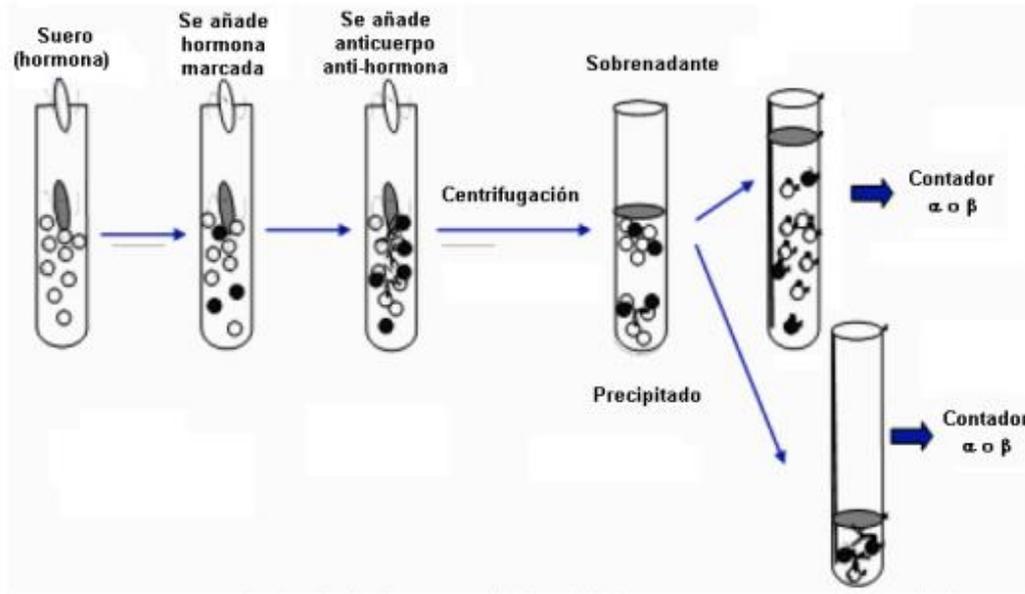


Ilustración 37: Esquema del principio general de radioinmunoensayo para medir hormonas.

Una vez que se mide la radiactividad se construye una curva con los resultados obtenidos con cantidades conocidas de hormonas marcadas y sin marcar. A esta curva se llevan los datos obtenidos de los sueros problemas y se obtiene la concentración de la hormona no marcada a investigar.

Se marca el anticuerpo con radioyodo sin mermar su inmunoreactividad. El marcaje de proteínas o péptidos con yodo radioactivo ^{125}I o ^{132}I puede llevarse a cabo por diferentes métodos. La incorporación del yodo a la molécula, se realiza en los aminoácidos aromáticos que forman parte de la estructura de la cadena peptídica: tiroxina, fenilalanina, triptófano o histidina

Aunque la técnica de RIA es extremadamente sensible y muy específica, requiere un equipo especializado, que sigue siendo el método menos costoso para llevar a cabo tales pruebas pero posee varios inconvenientes que derivan de la necesidad de utilizar isótopos radiactivos. Además de su peligrosidad y de la obligatoriedad de disponer de instalaciones adecuadas para su utilización, existen isótopos con un tiempo breve, que hay que reponer con frecuencia, a pesar de su elevado precio.²⁵

Gestión de Residuos Radiactivos

La empresa Nacional de Residuos Radiactivos (ENRESA) es la empresa encargada en España de la gestión de residuos nucleares (provengan de centrales nucleares o de otras instalaciones radiactivas como hospitales y centros de investigación relacionados con la energía nuclear). La

Técnicas realizadas

gestión de dichos residuos está definida en el Plan General de Residuos aprobado por el Parlamento.

Los protocolos para el tratamiento de residuos dependen de su nivel de actividad radiactiva:

Los residuos de media y baja radiactividad como es este caso, se introducen en bidones de acero que son trasladados al Centro de Almacenamiento de El Cabril (Córdoba), que ENRESA se encarga de gestionar. Todos estos almacenamientos de residuos están vigilados rigurosamente.



Ilustración 38: Bidones para residuos de isótopos radiactivos.

Los residuos generados en hospitales son de baja o media radiactividad y se trabaja con ellos en pequeñas cantidades por lo que, solamente es necesario la utilización de guantes.

Se utiliza la técnica de RIA para la determinación cuantitativa de la Testosterona libre en el Suero Humano, para la determinación de 17-OH progesterona y para la determinación de TSI.

a) Testosterona libre-RIA-CT

Para su determinación *in vitro* en hirsutismo y hipogonadismo.

La testosterona es el andrógeno circulante más potente. Es producido por los testículos en el hombre y por los ovarios en la mujer, así como por las glándulas suprarrenales. La testosterona total se compone de: la testosterona libre (3%), testosterona unida a la globulina transportadora de andrógenos y estrógenos (SHBG-GLAE 30%) y testosterona unida a albúmina.

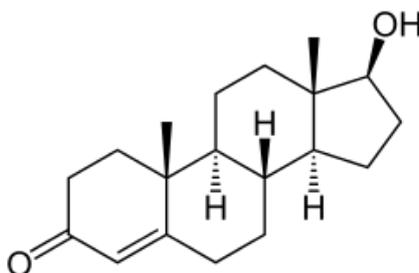


Ilustración 39: Testosterona

Técnicas realizadas

La testosterona libre (FT) se difunde a través de las membranas celulares y se liga a proteínas receptoras específicas (receptores andrógenos); los complejos receptores de testosterona trabajan como moduladores transcripcionales en regiones cis-reguladores de muchos genes.

Un exceso de andrógenos en mujeres provoca hirsutismo y señales de virilización. El porcentaje de testosterona en suero se determina antes y después del estímulo y de la supresión ovárica y suprarrenal para determinar el origen de la producción hormonal excesiva.²⁶

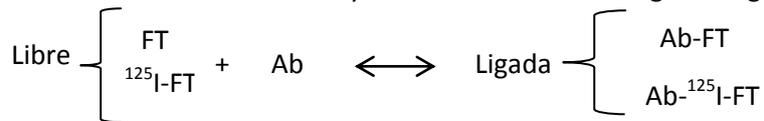
El hipogonadismo primario y secundario en hombres resulta en hipoandrogenación clínica, correlativa con el grado de fallo renal en la producción de testosterona. La determinación de testosterona en suero con la determinación de LH (hormona leutinizante) permite la evaluación correcta en estas condiciones.

Los ensayos para determinar la concentración de testosterona se basan en la determinación de testosterona total y libre.

La principal ventaja del ensayo de testosterona es que las concentraciones de testosterona libre están en equilibrio con la testosterona ligada a los receptores en los órganos.

Método de FT-RIA-CT

Este método obedece a la ley de la acción de masa según la siguiente ecuación.



Dado que las concentraciones de la ${}^{125}\text{I-FT}$ y de los anticuerpos recubiertos son constantes, la evolución de la ecuación es en función de las concentraciones de FT. La cantidad de ${}^{125}\text{I-FT}$ ligada al cuerpo es inversamente proporcional a la concentración de FT en la muestra.²⁷

Procedimiento

Se añaden 50 μL de cada calibrador y de cada muestra o suero de control en los tubos. Se añade 400 μL de trazador análogo de ${}^{125}\text{I-Testosterona}$, se mezcla y se incuba durante 2 horas, después se desecha la testosterona no ligada, y se añade 2 mL de la solución de lavado y se vuelve a desechar. Por último se cuenta la radiactividad fijada en cada tubo durante al menos 60 s empleando un contador de centelleo

Técnicas realizadas



Ilustración 40: Contador gamma para inmunoensayos (RIA)

Se emplea un sistema multidetector, consistente en doce contadores de centelleo automatizado que incorpora racks lavables de plástico para introducir las muestras en los pocillos

La concentración de Testosterona libre en las muestras se ha de leer directamente de la curva de calibración.

Resultados

Valores normales: 12.4-40 pg/mL

Con ovulación: 0-3.9 pg/mL

Con contraceptivos: 0-1.7 pg/mL

Post-menopáusica: 0-1.8 pg/mL

El aumento de los niveles de testosterona puede deberse a: tumor en los ovarios, cáncer testicular, hiperplasia suprarrenal congénita. Pero la disminución de testosterona puede ser por: enfermedad crónica, lesión o enfermedad en el hipotálamo, retraso en la pubertad.

	cpm	Concentración (pg/mL)	B/B ₀ (%)
Cal 0	7853.2	0	80.33
Cal 1	5857.8	1	59.92
Cal 2	4150.8	3	42.46
Cal 3	2379.4	11	24.34
Cal 4	1476.4	37	15.10
Cal 5	1195.6	63	12.23
Control 1	5135.3	2	52.53
Control 2	4367.3	3	44.67
Muestra 1	3887.5	4	39.77
Muestra 2	4938.6	2	50.52
Muestra 3	1961.1	18	20.06
Muestra 4	5629.8	1	57.59
Muestra 5	2405.4	11	24.61

Tabla 14: Tabla del ensayo de testosterona para un conjunto de pacientes reales.

Técnicas realizadas

B/B_0 : Cuentas (calibrador o muestra)/ (cuentas calibrador cero) x100

Cpm: cuentas totales.

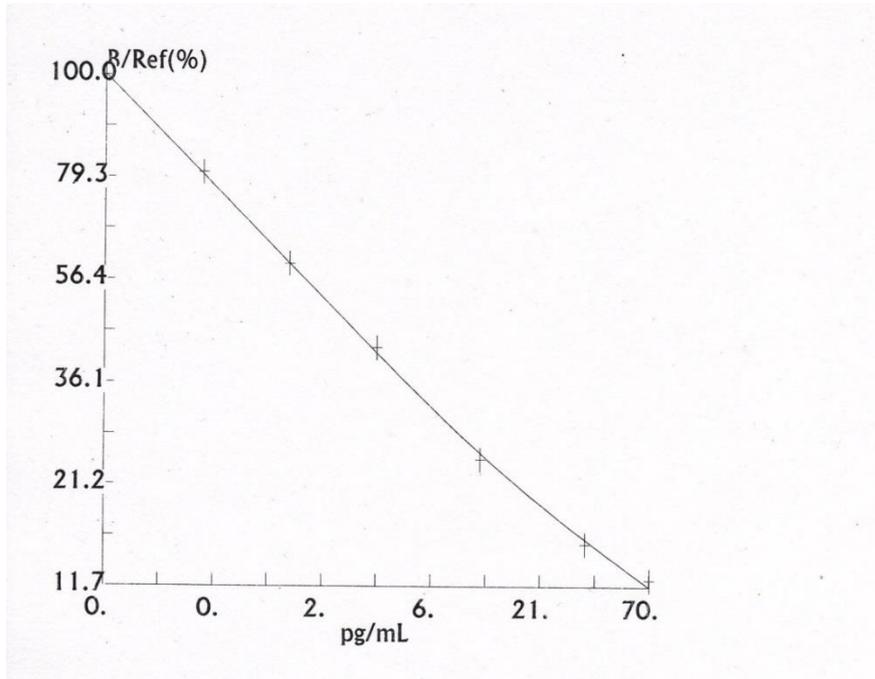


Ilustración 41: Gráfico del ensayo de testosterona para un conjunto de pacientes reales.

La mayoría de las muestras son de mujeres, los valores de testosterona libre se encuentran dentro de los límites salvo la muestra 3 y 5 que pertenecen a hombres por ello la concentración de FT es mayor.

b) 17-OH progesterona

La 17-OH progesterona (en adelante 17P) es el marcador bioquímico de la deficiencia de 21-hidroxilasa, responsable del 90-95% de las Hiperplasia Suprarrenal Congénita tanto clásicas como no clásicas.

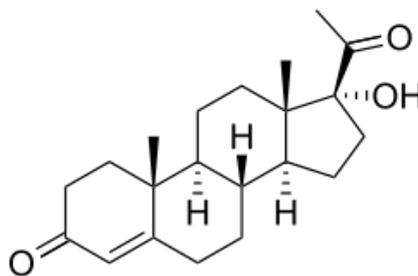


Ilustración 42: 17-OH progesterona

Se ha realizado determinaciones de 17-OH progesterona, una hormona producida por las glándulas suprarrenales y las gónadas. Esta prueba diagnóstica se utiliza principalmente para evaluar a bebés en busca de un trastorno hereditario que afecta a las glándulas suprarrenales, llamado hiperplasia suprarrenal congénita (HSC)²⁸, este error congénito del metabolismo común en lo general se caracteriza por la deficiencia en el C21-hidroxilasa enzima del sistema y

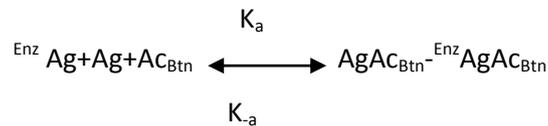
Técnicas realizadas

requiere terapia de reemplazo de esteroides. También se utiliza para identificar a personas con hiperplasia suprarrenal no clásica, una afección que ocurre cuando el cuerpo no produce suficiente cantidad de una sustancia que ayuda a las glándulas suprarrenales a fabricar cortisol.

Las concentraciones de 17P aumentan en la madre durante el embarazo y en la sangre fetal. Después del nacimiento, los valores disminuyen rápidamente hasta llegar a los valores normales en adultos de 2 a 7 días, por lo que es aconsejable no tomar muestras antes de los 3 días de vida.

Material y métodos

Los reactivos esenciales requeridos para un inmunoensayo enzimático incluyen anticuerpos, un conjugado de enzima antígeno y un suero que contiene un antígeno nativo. Se produce una reacción competitiva entre el antígeno nativo y el conjugado de la enzima-antígeno por un número limitado de sitios de unión con el anticuerpo. El proceso se muestra en la siguiente ecuación:



La reacción simultánea ocurre entre la biotina unida al anticuerpo y la estreptavidina inmovilizada en el micropozo. Después de la decantación se observa este efecto de separación del anticuerpo a la fase unida.

Procedimiento

Se añaden 25 µl del suero, del control o de la muestra en cada pocillo, se adicionan 50 µL de solución de enzima-17P, se agita y se adicionan 50 µL de reactivo 17P biotina a cada uno de los pozos. Se mezcla y se incuba durante 60 min. Se ha de decantar el contenido de la microplaca y se adicionan 350 µL del buffer de lavado, se decanta y se repite 2 veces. Se adicionan 100 µL de solución, sin agitación después de añadir el sustrato, se incuba durante 20 min a temperatura ambiente y se adicionan 50 µL de solución de parada a cada pozo, se mezclan y se lee la radiactividad en cada pozo durante 60 s (**Ilustración 40**).

La concentración de 17-OH progesterona se ha de medir a partir de la curva de calibración.

Resultados

Los valores normales y anormales: difieren para los bebés nacidos con bajo peso. En general los valores normales son estos:

- Bebés de más de 24 h: 0.2-1.4 ng/dL
- Adultos: < 200 ng/dL

La detección de niveles altos de 17-OH progesterona puede deberse a: tumores en la glándula suprarrenal o a hiperplasia suprarrenal congénita (HSC).

Técnicas realizadas

ID	cpm	Concentración (ng/ml)	B/B0 (%)
Cal 0	14572.8	0	B0
Cal 1	13250.0	0.10	90.92
Cal 2	11768.9	0.25	80.76
Cal 3	81836.2	1	56.15
Cal 4	5806.4	2.5	39.84
Cal 5	2810.7	10	19.29
Control 1	1570.0	25	10.77
Muestra 1	8184.8	1.06	56.16
Muestra 2	9140.6	0.75	62.72
Muestra 3	11908.0	0.22	81.71
Muestra 4	8958.6	0.8	61.47
Muestra 5	9172.7	0.74	62.94
Muestra 6	8880.8	0.83	60.94
Muestra 7	9412.2	0.68	64.59
Muestra 8	7299.3	1.46	50.09
Muestra 9	8004.1	1.14	54.92

Tabla 15: Tabla del ensayo de 17-OH progesterona para un conjunto de pacientes reales.

B/B₀: Cuentas (calibrador o muestra)/ (cuentas calibrador cero) x100

Cpm: cuentas totales.

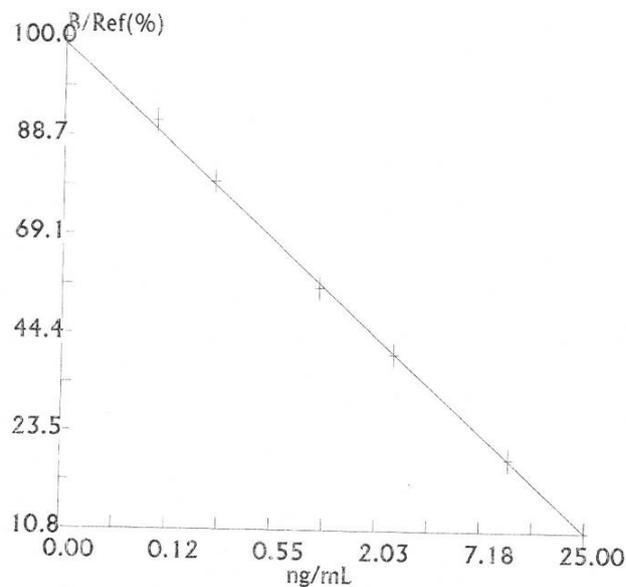


Ilustración 43: Gráfico del ensayo de 17-OH progesterona para un conjunto de pacientes reales.

Los resultados obtenidos para estos pacientes (niños) se encuentran dentro de los valores normales, no observamos valores muy altos y la curva de calibración es correcta.

2.4.2 Ensayo Progensa PCA3

El ensayo progensa PCA3 es una prueba de amplificación de ácido nucleico (NAAT) *in vitro* que detecta el ácido ribonucleico (ARN) del gen 3 de cáncer de próstata (PCA3) en los especímenes de orina del varón para generar un PCA3 Score.

Cuando se realiza el ensayo Progensa PCA3 en el laboratorio, las moléculas del ARN diana se aíslan de los especímenes de orina por medio de la captura seleccionada. Los oligonucleótidos («oligonucleótidos de captura») complementarios de las regiones específicas de la secuencia de las dianas están hibridizados a las dianas en el espécimen urinario. Se utiliza un oligonucleótido de captura distinto para cada diana. La diana hibridada se captura en micropartículas magnéticas que se separan del espécimen urinario en un campo magnético. Las etapas de lavado se utilizan para eliminar los componentes exógenos del tubo de reacción.

La amplificación de las dianas se produce por medio de la TMA, que es el método de amplificación del ácido nucleico basado en la transcripción que utiliza dos enzimas: la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) y la polimerasa ARN T7. Se utiliza un solo juego de cebadores para cada diana.²⁹

Análisis del antígeno prostático PSA

El antígeno prostático específico, o PSA, es una proteína producida por las células de la glándula prostática y que participa en la disolución del coágulo seminal. El análisis de PSA se utiliza para buscar la existencia de cáncer de próstata en hombres, un valor elevado de PSA quiere decir que existe la posibilidad de cáncer de próstata aunque la expresión del gen PSA es similar en células de próstata cancerosas y benignas, lo que significa que se eleva frecuentemente en enfermedades no tumorales de la próstata tales como la hiperplasia benigna (HBP), la prostatitis aguda y crónica o el infarto prostático.³⁰ La única manera de diferenciar estas enfermedades con el cáncer es realizar una biopsia. La especificidad del PSA es solo del 20%. El valor normal de PSA debe ser inferior a 4ng/ml, aunque un 25% de los varones con un PSA inferior a 4ng/ml, presentarán cáncer de próstata.

Análisis del gen de cáncer de próstata 3 PCA3

PCA3 es un ARN no codificante específico de la próstata sobreexpresado significativamente en las células del cáncer de próstata, con una medida 66 veces más elevada que los tejidos benignos adyacentes. Los niveles de ARN de PSA pueden así utilizarse para normalizar la cantidad de ARN específico de la próstata en muestras de prueba molecular.

Materiales y método

Las muestras se hacen por duplicado y los calibradores por triplicado. Las medidas se obtienen con un luminómetro leader HC+.

Técnicas realizadas



Ilustración 44: Luminómetro leader HC+

La detección se logra por medio del ensayo de protección de la hibridación (HPA) con sondas de ácido nucleico de cadena única y quimiluminiscentes que son complementarias del amplicón (Copia sintética de una secuencia de DNA o RNA). Se utilizan sondas distintas para cada amplicón diana. Las sondas de ácido nucleico marcadas se hibridan específicamente con el amplicón. El reactivo de selección diferencia las sondas hibridadas de las no hibridadas, inactivando el marcador de las sondas no hibridadas. Durante la detección, la señal quimioluminiscente producida por la sonda hibridada se mide en un luminómetro y su valor se comunica como unidades relativas de luz.

Procedimiento

Se colocan 100 μ L de TCR en cada tubo.

Se añaden 400 μ L de calibrador, control o muestra. Se introduce el rack en el instrumento SB 100 y se incuba durante 5-10 min.



Ilustración 45: Bomba de vacío y reactivo de lavado pca3

Posteriormente se ha de eliminar el contenido. Se adiciona 1 mL de reactivo de lavado y se trasfiere el rack al instrumento SB100 (el rack se agitará). Al final de la incubación elimine el reactivo de lavado de los tubos.

Se adicionan 75 μ L de reactivo de amplificación y 200 μ l de aceite de reacción (se observa un color rojizo). Se inserta el rack dentro del instrumento SB 100 Pre-Amp y se incuba. Una vez

Técnicas realizadas

que haya finalizado la incubación se añaden 25µL de enzima en cada tubo y se incuba durante 60 min. Cuando acabe la incubación se realiza su lectura (**ilustración 44**)

Resultados

Los ARN de PCA3 y PSA se cuantifican y el PCA3 Score se determina según la proporción de PCA3/PSA. Además de normalizar la señal PCA3, la medición del ARN del PSA sirve también para confirmar que la liberación de ARN específico de la próstata es suficiente para generar un resultado válido. Los PCA3 Score más altos ≥ 35 se correlacionan con una probabilidad más alta de una biopsia de próstata positiva.

2.4.3 Análisis de Catecolaminas

Las catecolaminas (también llamadas aminohormonas) son, neurotransmisores que se vierten al torrente sanguíneo. Son un grupo de sustancias que incluyen la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina, las cuales son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina que se encuentra en cualquier dieta normal y es captado de la circulación por un proceso de transporte activo hacia el interior axonal. Contienen un grupo catecol (un anillo de benceno con dos hidroxilos) y un grupo amino.

Las Catecolaminas mayores son dopamina, norepinefrina y epinefrina.³¹ Estas sustancias se metabolizan en otras sustancias las cuales salen del cuerpo a través de la orina. Este examen generalmente se hace para diagnosticar un tumor de las glándulas suprarrenales, llamado feocromocitoma y también se puede utilizar para diagnosticar neuroblastoma. Niveles elevados de catecolaminas en la orina diagnostica neublastoma en la mayoría de los casos.

Todas las catecolaminas se descomponen en sustancias inactivas que aparecen en la orina:

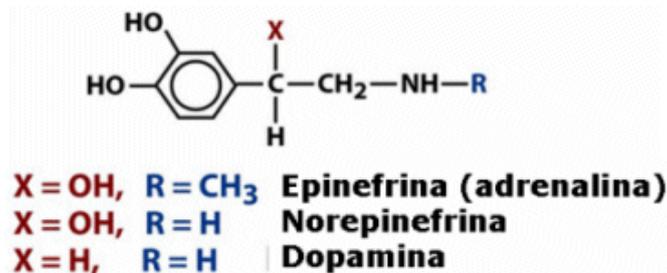


Ilustración 46: Catecolaminas.

- Dopamina: se convierte en ácido homovalínico (AHV)
- Norepinefrina: se convierte en normetanefrina y ácido vanililmandélico (AVM)
- Epinefrina: se convierte en metanefrina y AVM

Algunos alimentos pueden llegar a alterar la cantidad de catecolaminas como el café, chocolate, cacao, etc.

Material y método

En la actualidad se determina las catecolaminas en orina por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) con detector electroquímico como alternativa a los métodos fluorimétricos.

Técnicas realizadas

El HPLC permite separar los metabolitos de alfa-metildopa, los cuales interferirían si se utilizara el método de trihidroxiindoles.

Condiciones del experimento cromatográfico: flujo: 0.5mL/min, Tº 35°C, sensibilidad: 20, potencial: 0.7, fase móvil: acetonitrilo-agua, fase reversa C18. Detector electroquímico.

Fundamento del HPLC con un detector electroquímico

Este detector está basado en la oxidación del analito, eluido mediante un electrodo adecuado, registrándose la intensidad de corriente. La detección está basada en el conocido polarógrafo de gota de mercurio, este instrumento consta de un par de electrodos a los que se le aplica un potencial de oxidación suficiente para generar una corriente de difusión, el proceso es cuantitativo.



Ilustración 47: HPLC para la determinación de catecolaminas y metanefrinas

Procedimiento

Se mezcla 1 mL de orina acidificada con estándar interno y REAG 1 (reactivo de dilución/lavado). A continuación, se aplica la mezcla a una columna desechable de intercambio catiónico. Y se elimina el exceso de muestra de la columna con REAG 1. Durante la elución con REAG 2 (reactivo de elución) las catecolaminas forman un complejo con los iones de borato y se eluyen selectivamente de la columna. El REAG 3 (reactivo ácido) se añade antes del análisis de HPLC, que se realiza por cromatografía en un cartucho de fase reversa. Los compuestos se detectan gracias a su actividad electroquímica. La cuantificación se basa en la comparación de los ratios de altura de picos en la muestra desconocida con el ratio correspondiente obtenido por un calibrador de orina.

Resultados

La determinación de catecolaminas se utiliza principalmente para ayudar a detectar o descartar feocromocitomas en personas sintomáticas. En ocasiones se pueden obtener resultados falsamente positivos al verse afectados por alimentos o en situaciones de estrés.

Técnicas realizadas

Valores normales:

Norepinefrina: 12.1-85.5µg/24h

Epinefrina: 1.7-85.5µg/24h

Dopamina: 0-498µg/24h

Número de pico	Tiempo de retención (min)	Nombre de pico	Altura	Conce (µg/L)
1	4.05	Norepinephrine	57141	32.2
2	4.62	Epinephrine	6604	3.7
3	6.34	Estandar Interno	274263	---
4	8.36	Dopamine	394770	135.9

Tabla 16: Tabla del ensayo de las Catecolaminas para un paciente real.

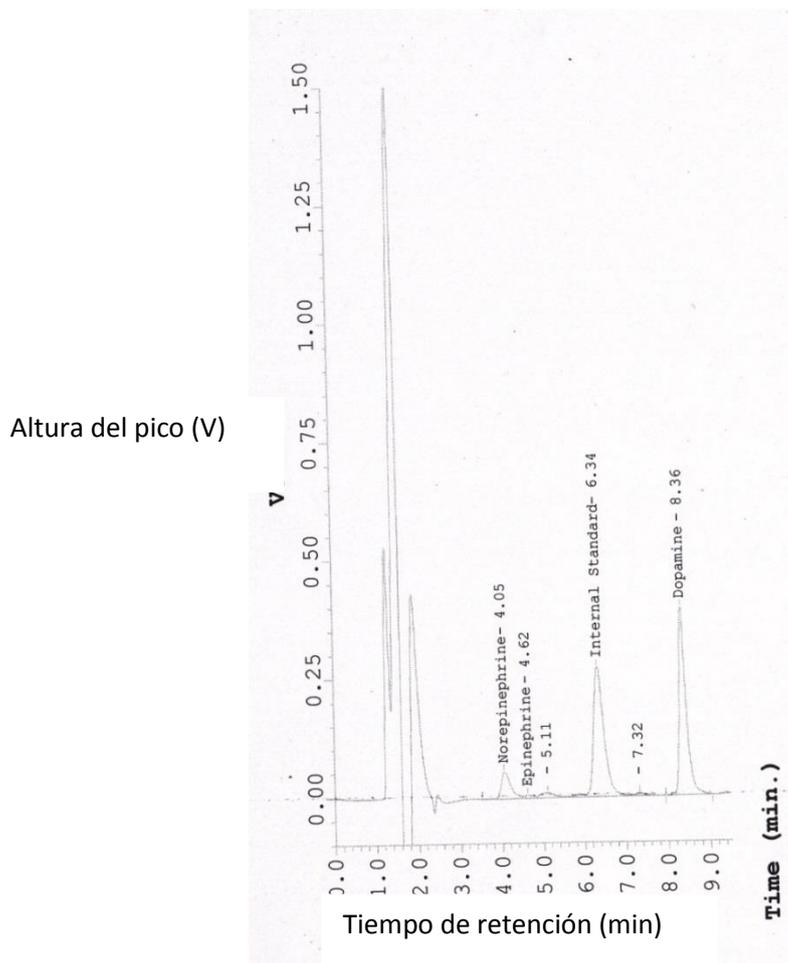


Ilustración 48: Gráfica del ensayo de las catecolaminas para un paciente real

Este paciente presenta concentraciones normales de catecolaminas, por lo que resulta improbable que tenga un feocromocitoma.

2.4.4 Análisis de VMA/HVA/5-HIAA

La determinación de metabolitos ácidos de catecolaminas se ha demostrado muy útil para el diagnóstico y el seguimiento de pacientes con feocromocitoma y tumores neurogénicos relacionados. Aproximadamente uno de cada 500 pacientes con hipertensión puede desarrollar este tipo de tumor que puede curarse mediante intervención quirúrgica.

Entre los metabolitos ácidos de las catecolaminas están: el ácido vanilmandélico (VMA) es el metabolito más abundante excretado en la orina, producto de la conversión hepática de las catecolaminas en compuestos oxidados y metilados. Los niveles de ácido vanilmandélico en orina reflejan la producción endógena de catecolaminas.³²

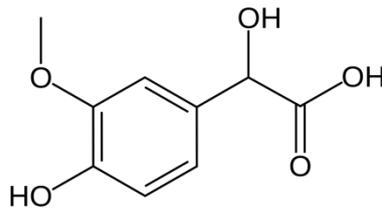


Ilustración 49: Ácido vanilmandélico (VMA)

La aplicación de pruebas de cribaje con especificidad reducida ha conducido muchas veces a resultados falsos positivos.³³

La determinación del ácido homovanílico (llamado a partir de ahora HVA) es el metabolito final de la dopamina, catecolamina que se sintetiza en el Sistema Nervioso Central y actúa como neurotransmisor. Es un test muy valioso en el diagnóstico de algunas afecciones del Sistema Nervioso y se utiliza para la identificación de neuroblastoma y para el seguimiento de la respuesta a la terapia.

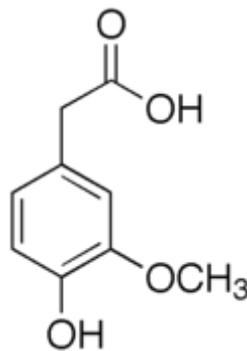


Ilustración 50: Ácido homovanílico (HVA)

El ácido 5-hidroxiindolacético (llamado a partir de ahora 5-HIAA) es el metabolito principal de la serotonina en el cuerpo humano. Su cuantificación en orina indica los niveles corporales de serotonina. Su análisis sirve para el diagnóstico de tumores carcinoides y de células enterocromafines³⁴ (son un tipo de células entereocromafines presentes en el epitelio que cubre el lumen del tracto gastrointestinal y del tracto respiratorio del intestino delgado) caracterizadas por una elevada síntesis de serotonina.

Técnicas realizadas

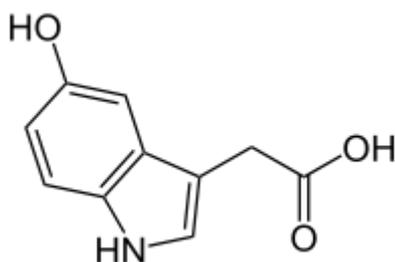


Ilustración 51: Ácido 5-hidroxiindolacético.

Material y métodos

La determinación de VMA, HVA y 5-HIAA por HPLC ofrece una separación específica y precisa que satisface todos los requisitos del diagnóstico. (**Ilustración 47**)

Condiciones del cromatógrafo: flujo: 0.8mL/min, Tº 40°C, sensibilidad: 10, potencial: 0.8, fase móvil: acetonitrilo-agua, fase reversa C8. Detector electroquímico.

Procedimiento

Se diluyen 50 µL de una muestra de orina acidificada con 50 µL de una solución de trabajo de estándar interno (INT STD) y 1 mL de REAG 1 (reactivo de dilución de lavado). Tanto el VMA como el 5-HIAA se utilizan como estándares internos. La mezcla se carga en la columna desechable rellena de una resina de intercambio iónico pretratada con REAG 1. Los componentes neutros y básicos de la muestra y proteínas serán eliminados. En el siguiente paso se producirá la elución de VMA, HVA y 5-HIAA y de los estándares internos. Se inyecta una parte alícuota del eluido en un sistema HPLC isocrático, las muestras se analizan en la columna de fase inversa.

Resultados

Valores normales:

VMA: 1.8-6.7 mg/día.

HVA: 0.0-6.2 mg/día.

5-HIAA: 0.7-8.2 mg/día.

Un día antes de la recogida de la muestra de orina, el paciente deberá abstenerse de comer plátanos, vainilla, chocolate, café, nueces y comida vegetal ya que pueden alterar los resultados y no ingerir medicamentos que contengan fenotiacinas.

Número del pico	Tiempo de retención (min)	Nombre del pico	Altura	Conc (mg/L)
1	4.84	VMA	4255	0.6*
2	7.22	Estándar interno	202958	---
3	9.35	5-OHIAA	1191	2
4	13.23	HVA	34378	1.6

Técnicas realizadas

5	14.95	Estándar interno 2	3651	----
---	-------	-----------------------	------	------

Tabla 17: Tabla del ensayo de VMA, HVA y 5-HIAA para un paciente real.

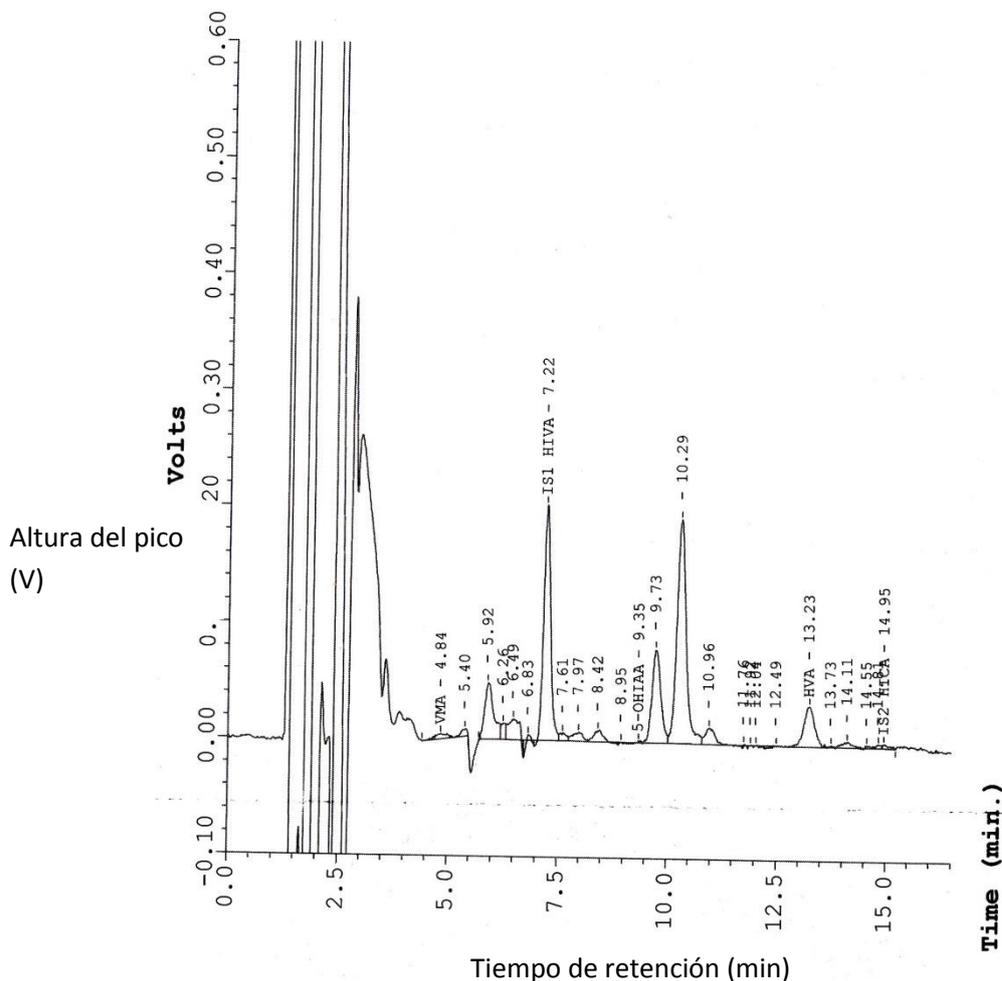


Ilustración 52: Gráfica del ensayo de VMA, HVA y 5-HIAA para un paciente real.

En este paciente se observa que presenta valores normales tanto de HVA y de 5-HIAA, sin embargo el valor de VMA es un poco bajo frente al de referencia. Normalmente valores bajos se puede deber a estrés severo, ansiedad aguda y en raras ocasiones feocromocitoma o neuroblastoma.

2.4.5 Análisis de las Metanefrinas

La Metanefrina (metadrenalina) es un metabolito de la epinefrina (adrenalina) producido por la acción de la enzima catecol-O-metiltransferasa sobre la epinefrina.

La determinación de metanefrina (MN) y normetanefrina (NM) en la orina, denominadas colectivamente metanefrina, suele llevarse a cabo en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con feocromocitoma y tumores neurogénicos relacionados. Se ha observado que el 0.1-0.5% de pacientes con hipertensión pueden desarrollar este tumor. Los métodos de

Técnicas realizadas

determinación de las metanefrinas se basan tradicionalmente en la formación y medición de vanilina a 360nm.³⁵

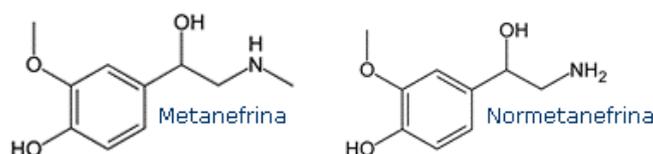


Ilustración 53: Metanefrinas (NM y MN).

Material y métodos

Se han desarrollado métodos de HPLC que permiten cuantificar la MN y la NM y la 3-metoxitiramina. Estos métodos de HPLC mejoran la precisión y especificidad de los ensayos anteriores (**Ilustración 47**)

Condiciones del cromatógrafo: flujo: 0.7mL/min, Tº: 58°C, sensibilidad: 25, potencial: 0.65-0.7, fase móvil: acetonitrilo-agua, fase reversa C18. Detector electroquímico.

Procedimiento

Se diluyen 500 µL de una muestra de orina acidificada con una solución de estándar interno y agua destilada y se hidroliza con el reactivo 1. Tras realizar la dilución con reactivo 5, la mezcla se vierte en la columna de intercambio catiónico. El exceso de la muestra y las sustancias interferentes se eliminan en la columna con agua destilada. La columna se eluye con reactivo 6 y el eluido se vierte directamente en la columna de intercambio aniónico. Tras lavar la columna con agua destilada, las metanefrinas se eluyen con reactivo 7.

Se inyecta una parte alícuota diluida del eluido en un sistema HPLC isocrático, las muestras se separan en un cartucho de fase inversa, se detectan mediante un detector electroquímico y se evalúan con la ayuda de un estándar interno.

Resultados

Aunque anteriormente hemos indicado que para la determinación de feocromocitoma se utilizaban las catecolaminas, se ha descubierto que la determinación de las metanefrinas plasmáticas libres presenta un poder diagnóstico superior a la anterior prueba y han sido recomendadas como prueba única para el diagnóstico de feocromocitoma para un determinado número de pacientes:

- Pacientes en los que se descubre accidentalmente una masa suprarrenal.
- Pacientes con antecedentes familiares de feocromocitoma.
- Pacientes con predisposición hereditaria conocida para un feocromocitoma.

En la actualidad se utilizan ambas pruebas para el diagnóstico de feocromocitomas.

Técnicas realizadas

Valores normales:

Normetanephrine: 162-527 µg/día

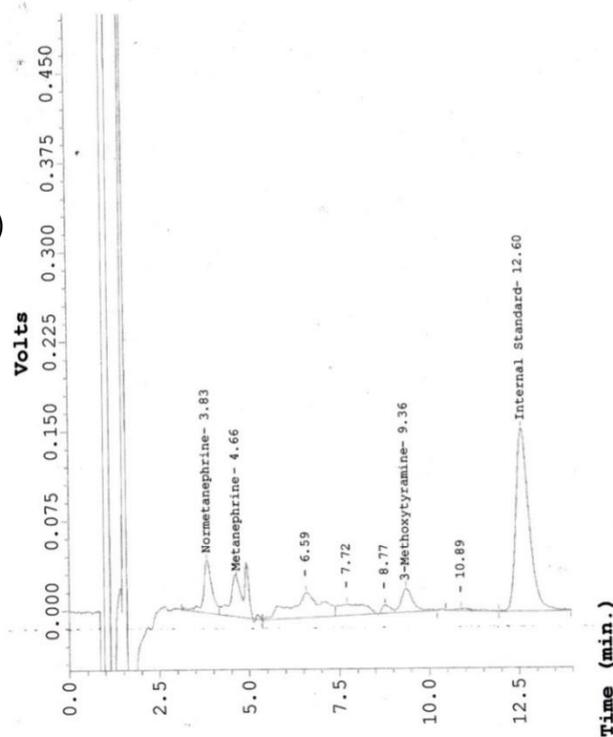
Metanephrine: 64-302 µg/día

3-Methoxytyramine: 103-434 µg/día

Número de pico	Tiempo de Retención (min)	Nombre del pico	Altura	Conc (µg/L)
1	3.83	Normetanephrine	43985	174.6
2	4.66	Metanephrine	32149	165.4
3	9.36	3-Methoxytyramine	19423	71.9*
4	12.60	Estandar interno	152842	-

Tabla 18: Tabla del ensayo de las metanefrinas para un paciente real.

Altura del pico (V)



Tiempo de retención (min)

Ilustración 54: Gráfica del ensayo de las metanefrinas para un paciente real

En este paciente se observan valores normales para las metanefrinas aunque la 3-methoxytyramine esté un poco baja, por lo que resulta casi improbable la presencia de feocromocitomas.

2.5 Servicio de análisis Bioquímicos

Realiza diagnósticos analíticos, pruebas funcionales y de laboratorio que ayuda en el diagnóstico de enfermedades, a la terapéutica médica y a la prevención de la enfermedad.

2.5.1 Comparación de niveles de litio sérico por dos métodos comerciales frente a determinación por Absorción Atómica.

El litio es el más ligero de los metales alcalinos y presenta algunas propiedades fisicoquímicas anómalas debido a su gran diferencia de electronegatividad respecto a los elementos que le siguen en el grupo 1A del sistema periódico.

El litio, el tercer elemento del sistema periódico, se utiliza principalmente para tratar la fase maníaca de los trastornos afectivos, manías y enfermedades maniaco-depresivas. No se conoce el mecanismo exacto mediante el que el litio actúa como agente estabilizador anímico.³⁶

El tratamiento típico para personas con algún desorden mental moderadamente grave, en un adulto de tamaño medio (75 kg), es de una dosis diaria inicial de 1.5-2.0 g de carbonato de litio, por vía oral, pero se debe de mantener una dosis en el torrente sanguíneo de 0.8 a 1.5 miliequivalentes (meq) por litro. Por encima de este nivel, se han observado diversos efectos secundarios, tales como calambres abdominales, náuseas, vómitos, por ello, su supervisión en pacientes es extremadamente importante ya que si el nivel es demasiado bajo, los síntomas no estarán bajo control, en cambio, si el nivel es muy alto la condición tóxica resultante puede ser peligrosa, existe un riesgo significativo de toxicidad por encima de los 1.5mmol/L.

Material y método

Se emplean alícuotas de 200 µL de muestras séricas. Estas alícuotas son analizadas por *Absorción Atómica* con llama y *colorimetría*. En nuestro caso se ha intentado correlacionar por tanto, la determinación de la concentración de ión litio en suero por tres métodos comerciales: la espectroscopia de absorción atómica con llama (Perkin Elmer 110 B) y dos métodos colorimétricos: el sistema ADVIA® 2400 y el analizador de química clínica Dimension® EXL 200 ambos de Siemens.

Las distintas muestras fueron analizadas dos veces por semana por ambos métodos y se efectuó el control de calidad en cada uno de ellos según sus respectivos protocolos, comenzando el estudio a mediados de abril y finalizado a principios de junio.

Procedimiento

El analizador de química clínica Dimension® EXL 200 (**ilustración 55**) permite procesar volúmenes de actividad medios y altos e integra mediciones espectrofotométricas y de inmunoanálisis heterogéneo, por lo que ofrece una amplia disponibilidad de técnicas.³⁰ El método para Li emplea un compuesto patentado, 7-nitro-2, 12-dicarboxil-16, 17-dihidro-5H, 15H-dibenzo[b,i] [1, 11, 4, 5, 7, 8]dioxatetraazacicotetradecina (colorante de litio) que reacciona específicamente con el ion Li⁺ en una mezcla alcalina de agua y dimetilsulfoxido para formar un complejo binario no covalente.

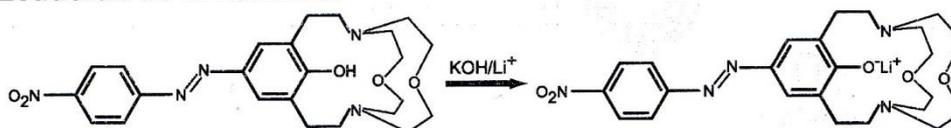
Técnicas realizadas



Ilustración 55: Sistema Dimension EXL 200

Los sistemas ADVIA® 2400 (**ilustración 56**) se basan en la formación de complejos de los iones de litio con un cromoiónico específico para el litio en una solución alcalina. Este método es una colorimetría directa del punto final de la reacción química. La concentración de litio es proporcional al aumento de la absorbancia, que se debe a la formación de un complejo de litio. La absorbancia de reacción se mide a 505/694 nm.

Ecuación de la reacción



Ecuación 1: Reacción de litio con un cromoiónico.³⁷



Ilustración 56: Sistema Advia 2400

Espectroscopia de absorción atómica con llama (Perkin Elmer 110 B): (**ilustración 57**) en la atomización por llama, la disolución acuosa de la muestra se dispersa o nebuliza como una fina nube, y luego se mezcla con el combustible gaseoso y oxidante para arrastrarla al mechero. El disolvente se evapora en la parte inferior o base de la llama. Las partículas sólidas finamente divididas son arrastradas a la región central de la llama en la que se forman átomos e iones gaseosos a partir de las partículas sólidas. Solo una pequeña fracción de la muestra es atomizada dado que la velocidad a la que pasa la muestra a través de la llama es muy elevada.

Técnicas realizadas



Ilustración 57: Espectroscopia de absorción atómica con llama

Resultados

De las ciento dos muestras de suero se obtuvieron los resultados que se expresan en la ilustración 58. Sus gráficas de control de calidad (**ilustración 59 y 60**) que son un tipo de gráfico en el cual los datos de control son presentados de manera tal que proveen una indicación visual rápida y precisa de que un determinado proceso se encuentra funcionando de manera adecuad³⁸ y su precisión en la **tabla 19**.

Controles	Advia 2400	Dimension	Abs atómica
C1	3.4	3.4	5
C2	3.3	2.4	3.9

Tabla 19: CV en % de los controles 1 y 2.

Se observa una muy buena correlación sobre todo entre el Advia 2400 y la Espectroscopia de absorción atómica (azul). Precisiones muy similares entre Advia 2400 y Dimension, presentando una mejor precisión este último

Considerando exactitud y precisión en conjunto, los dos métodos colorimétricos resultan satisfactorios o semeja un poco mejor el método Advia 2400. En la actualidad el litio se lleva a cabo en absorción atómica, un método mucho más complicado, ya que precisa de una serie de cálculos y se tarda más en la medida de cada una de las muestras.

Técnicas realizadas

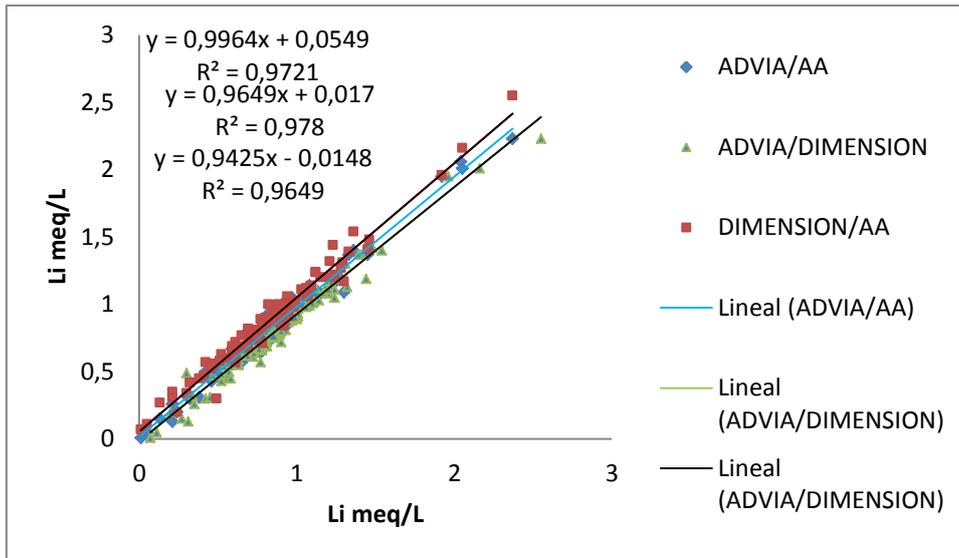


Ilustración 58: Correlación del Litio para un conjunto de pacientes reales.

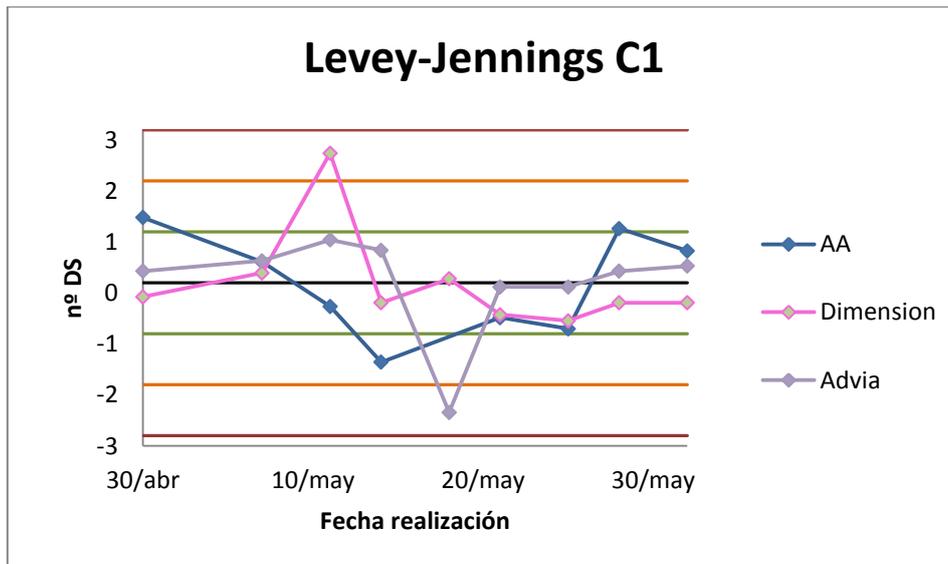


Ilustración 59: Gráfica de Levey-Jennings para C1.

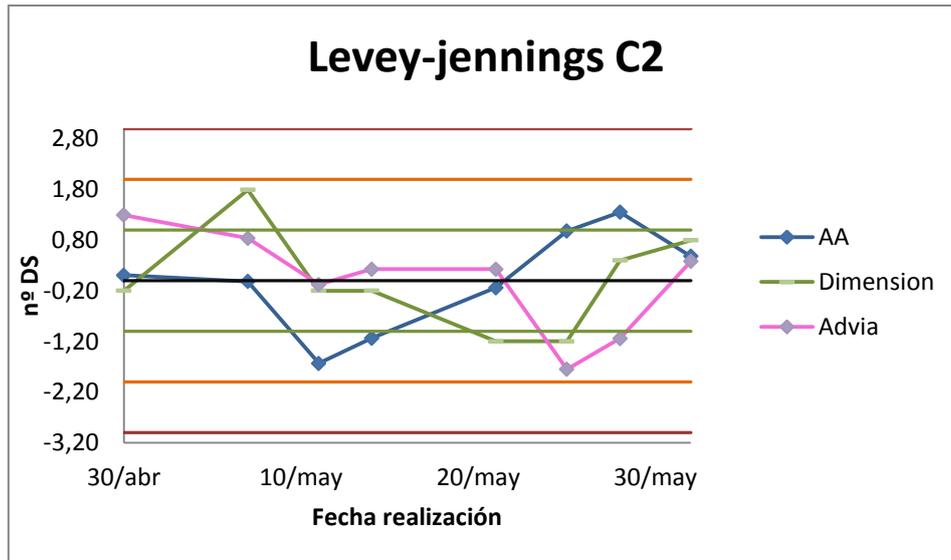


Ilustración 60: Gráfica de Levey-Jennings para C2

2.6 Sección de orinas

2.6.1 Espermigramas

El espermograma es la prueba que se realiza para conocer la funcionalidad del espermatozoide, ofreciendo información detallada de la fracción celular del eyaculado. Facilita información acerca del estatus fértil del hombre y además ayuda a decidir que técnica de reproducción asistida es la más adecuada para el tratamiento de la pareja.

El estudio de microscópico consiste en hacer un recuento de su movilidad, índice de vitalidad y estudio morfológico.

En cuanto a su movilidad pueden ser:

- Espermatozoides inmóviles (IM)
- Espermatozoides con movilidad no progresiva (NP)
- Espermatozoides con movilidad progresiva (PR): lineal o en círculos amplios.³⁹

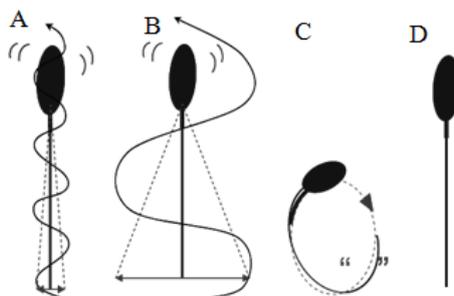


Ilustración 61: Tipos de movilidad de los espermatozoides. a) Progresivo rápido, b) progresivo lento, c) móvil no progresiva y d) inmóvil.

Técnicas realizadas

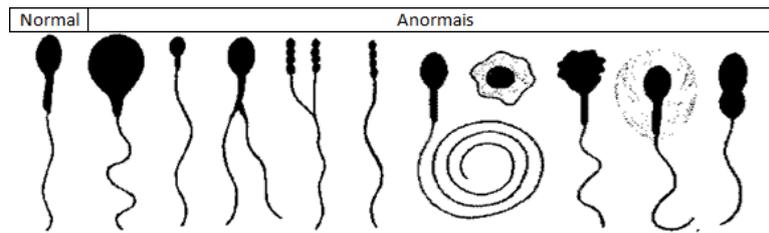


Ilustración 62: Morfología de los espermatozoides.⁴⁰

En los espermatozoides se pueden observar aglutinaciones o agregaciones. Las agregaciones son la adherencia de espermatozoides (móviles e inmóviles) a células espermáticas o dentritos pero no son específicas. En cambio las aglutinaciones, son espermatozoides móviles adheridos a otros espermatozoides móviles estas sí que son específicas.

Material y método

Para su realización es imprescindible un microscopio que esté dotado de contrastes de fases y que cuente con una platina termostatazada a 37°C. Para analizar la muestra se utiliza un simple portaobjetos con un cubreobjetos que tenga una profundidad de campo de 20 micras para que no se obstaculice el libre movimiento de los espermatozoides.

Fundamento del microscopio de contraste de fases

Con esta técnica de iluminación se aumenta el contraste de manera notoria entre las partes claras y oscuras de las células transparentes.

El principio es semejante al de campo oscuro; se ilumina la muestra con un cono hueco de luz pero mucho más estrecho. Se emplea un filtro en forma de anillo, que disminuye la intensidad de la luz y al mismo tiempo provoca un retraso o desfase en la longitud de onda de la luz. Este método induce variaciones sutiles en el índice de refracción (determinado por el espesor) de los especímenes translúcidos permitiendo visualizar una riqueza de detalles muy finos en la estructura, los cuales pasarían desapercibidos con una iluminación de campo claro



Ilustración 63: Microscopio de contraste de fases.

Técnicas realizadas

Procedimiento

Tras la recogida de muestra primero se realiza un estudio macroscópico, que incluye la evaluación del volumen de semen, el aspecto, el color, etc. Posteriormente se realiza un análisis microscópico, el cual está enfocado en analizar las características del espermatozoide.

Resultados

Paciente 1: se observa que presenta una gran cantidad de espermatozoides no progresivos (185 millones por mL, verdes) y estáticos (55.3 millones por mL, rojos) en cuanto a su velocidad el recuento de rápidos son 189.6 millones por mL y lentos 44 millones por mL (**ilustración 64-65**)

La muestra de este paciente puede ser utilizada para la inseminación artificial ya que más del 85% de los espermatozoides presentan una calidad muy buena (A) + buena (B) y se observan más de 100000 espermatozoides en la muestra.

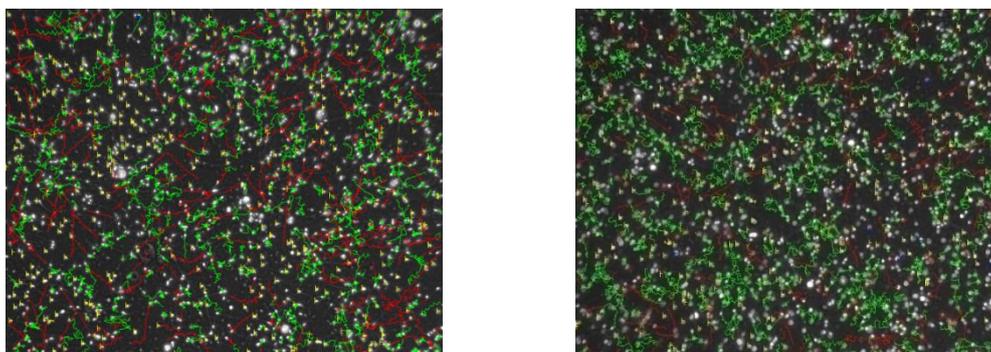


Ilustración 64: Captura de campo del paciente 1

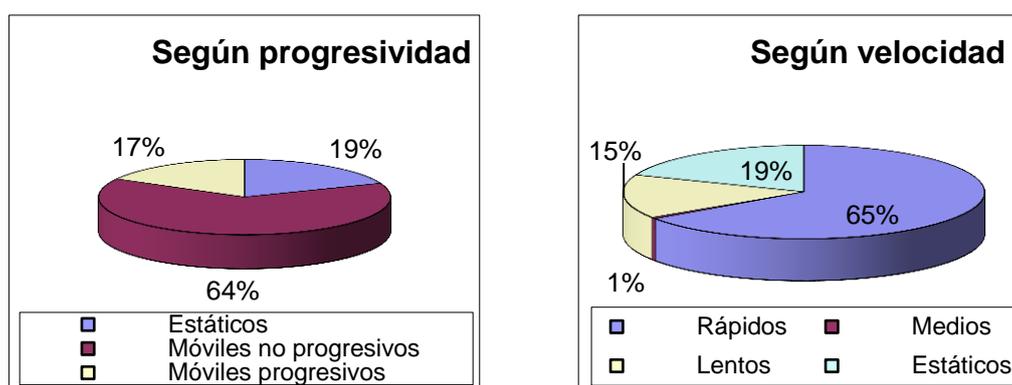


Ilustración 65: Gráficos de distribución según el tipo de espermatozoides.

2.7 Robótica utilizada en los laboratorios clínicos

En medicina, los robots se han aplicado principalmente en el área de la cirugía, traumatología, oftalmología, telemedicina e imagenología pero en los últimos años ha surgido un avance de la robótica en los laboratorios clínicos, para reducir el volumen de trabajo y la exposición del personal hacia posibles biopeligros y para ayudar a obtener resultados más precisos y correctos.

Beneficios:

Reducir el tiempo hasta los primeros resultados.

Mejorar el posicionamiento y la exactitud de distribución de líquidos.

Cargar una amplia variedad de muestras sobre la marcha.

Integrar la preparación y el procesamiento automáticos de las muestras.

Aumentar la productividad de los ensayos.

Detectar frascos vacíos de reactivos y burbujas en las líneas.

Reducir el tiempo medio entre fallos (tiempo medio entre fallos, MTBF) de los instrumentos y mejorar la facilidad de uso

Se han descrito tres categorías de robots en la medicina y laboratorios clínicos⁴¹

- Pasivos: rol limitado, bajo riesgo.
- Restringidos: mayor autonomía y realizan tareas más invasivas.
- Activos: el robot está involucrado en el procedimiento con riesgo.

El sistema procesa a la hora 880 muestras: 400 de suero, 300 de hematimetría (contabilización de células sanguíneas como glóbulos rojos, blancos, leucocitos) y 180 tubos de hemostasia (datos de coagulación). El recorrido es un circuito cerrado, aunque las muestras, al llegar al final de las cadenas, son almacenadas por el propio sistema en neveras. La mayor parte de la robótica utilizada en este laboratorio es de la marca Siemens®

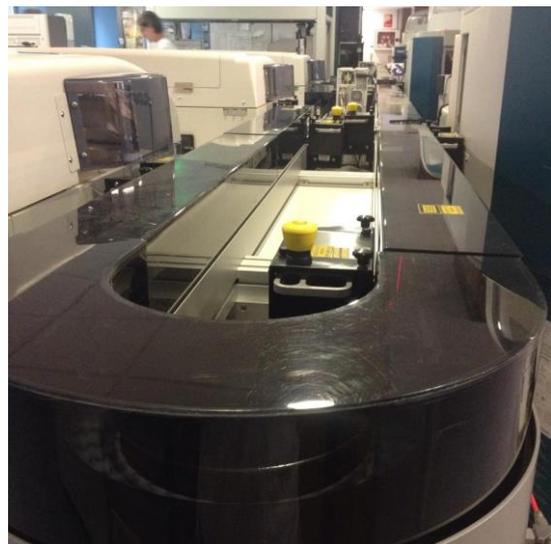
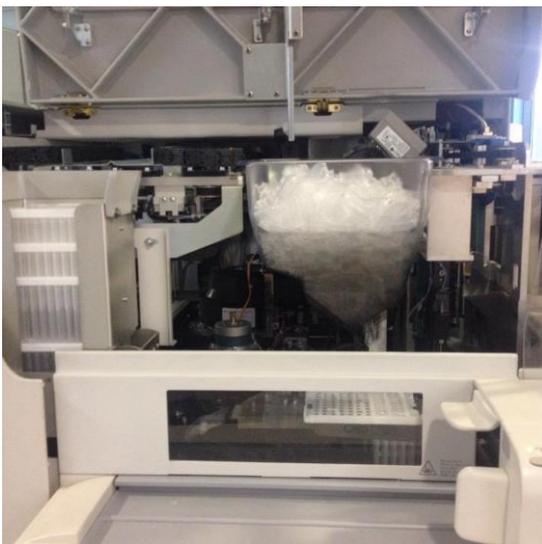


Ilustración 66: Robótica utilizada en los laboratorios de análisis clínicos.

3. Conclusiones

Conclusiones

Mi estancia en el Laboratorio de Análisis Clínicos para realizar este TFM me ha permitido mejorar en mi formación y alcanzar diversas conclusiones a distintos niveles:

- En los laboratorios de análisis clínicos se utilizan procedimientos multidisciplinarios en los que están implicadas la química y la bioquímica, con el fin de interpretar la información necesaria para la prevención, el diagnóstico, el pronóstico, la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.
- Para un adecuado manejo de los procedimientos analíticos se requiere un buen nivel de comprensión fundamental de los procesos implicados en el método.
- Existen factores muy diversos que llevan a elegir entre los distintos procedimientos analíticos disponibles para la realización de un análisis concreto.
- Es preciso realizar frecuentes controles de calidad de los equipos para asegurar la utilidad clínica de los resultados. Sería recomendable realizar, además, ensayos de intercalibración.
- Un diagnóstico médico acertado depende en gran medida de los análisis realizados en el laboratorio.

4. Anexos

Anexos

Modelos de tablas que utilizan los técnicos de laboratorio para cubrir los datos de las siguientes técnicas: Disacaridasas,

Tabla Disacaridasas/Fa

Fecha:

Nº Serie:

Fosfatasa alcalina

	Abs-1	Abs-2
F-0		
F-1		
F-2		
F-3		
F-4		
F-5		
B:		
PN		
PP		

Proteínas

	Abs-1	Abs-2
P-0		
P-1		
P-2		
P-3		
P-4		
P-5		
B:		
PN 1:100		
PP 1:100		

Disacaridasas (Glucosa)

	Abs-1	Abs-2	Blanco
G-0			
G-1			
G-2			
G-3			
G-4			
G-5			
Control-G			
B:			
L			
T			
S			
I			
M			
B:			
L			
T			
S			
I			
M			
B:			
L			
T			
S			
I			

Serie	Nº Muestra	Tamaño

Anexos

M			
B:			
L			
T			
S			
I			
M			
BRD			
L			
T			
S			
I			
M			

Tabla 20: Tabla de las Disacaridasas/Fa

5. Bibliografía

Bibliografía

- [1] Servicio Galego de SAÚDE. (2010). Guía Docente: Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. Recuperado el 16 de abril del 2015 de: http://hospitalcoruna.sergas.es/docencia/fespecializada/Documents/MEMORIA_DOCENTE_XXIAC_2011.pdf
- [2] Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. *Libro Blanco de la Hematología y Hemoterapia en España*. Editores Médicos, S.A. EDIMSA. (pp. 39-41). Recuperado el 17 de abril del 2015 de: http://libroblancohematologia.es/index_libro.php
- [3] Ruiz Argüelles, G.J. (1994). *Fundamentos de Hematología*. Madrid: médica panamericana...
- [4] Ouchterlony O. (1948). In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand*; 25, 186.
- [5] Mancini G, Carbonara AO and Heremans JF. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2 (5), 235-254.
- [6] Fernández Meléndez, Salvador. (1999). *Sensibilización a Anisakis simplex en Málaga. Estudio en pacientes con urticaria aguda recidivante*. Tesis Dr. Medicina y Cirugía. Fac Medicina. Málaga.
- [7] American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement. (2003). Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Am J Resp Clin Care Med*. 168, 818-900
- [8] Laurell CB, Eriksson S. (1963). The electrophoretic alpha 1-globulin pattern of serum in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Invest*. 15, 132-40
- [9] Brantly M. (2002). Alpha 1-antitrypsin: not just an antiprotease. Extending the half-life of a natural anti-inflammatory molecule by conjugation with polyethylene glycol. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 27, 652-4
- [10] C Sierra^a, MI Vicioso^b, A Barco^a, L del Río^a, E Sánchez^c. (2001). Enteropatía pierde-proteínas. Detección y causas más frecuentes. *An pediatr*, 54, 1. Recuperado el 21 de abril del 2015 de: <http://www.analesdepediatria.org/es/enteropatia-pierde-proteinas-deteccion-causas-mas/articulo/13012930/>
- [11] Rafael Vidala, Ignacio Blancob., Cassac, Francisco., Jardín, Rosend., Miravittlese, Marc y Comité del Registro Nacional de Pacientes con Déficit de de Alfa-1-Antitripsina. (2006). Diagnóstico y tratamiento del déficit de alfa-1-antitripsina. *Arch Bronconeumol*, 42(12),645-659. Recuperado el 20 de abril del 2015 de: <http://www.archbronconeumol.org/es/diagnostico-tratamiento-del-deficit-alfa-1-antitripsina/articulo/13095974/>
- [12] X. Fuentes Arderiu; M.J., Castiñeiras Lacambra; J.M., Queraltó Compañó. (1998). *Bioquímica clínica y Patología molecular*. 2ª edición. Barcelona: Reverté.
- [13] Sernka, T.J., Jacobson, E.D. (1982). *Fundamentos de Fisiología gastrointestinal*. Barcelona: Reverté.
- [14] Bárcena Ruiz, José Antonio., García Alonso, Concepción., Padilla Peña, Carmen Alicia., Martínez Galisteo, Emilia., Díez Dapena, Jesús. Caracterización cinética de la fosfatasa alcalina.

Bibliografía

Departamento de Bioquímica y Biología molecular. Recuperado el 26 de abril del 2015 de:
<http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/30%20FOSFATASA%20ALCALINA.pdf>

- [15] Garrido Pertierra, Amando, Teijón Rivera, Jose María, Blanco Gaitán, Dolores, Villaverde Gutiérrez, Carmen, Mendoza Oltras, Carlos, Ramírez Rodrigo, Jesús. (2006). *Fundamentos de bioquímica estructural*. 2ª edición. Madrid: Tébar, S.L.
- [16] Bacchus, HI. Serum seromuroid and Acid Mucopolysaccharides in Marfan syndrome. *J. Lab. Clin. Med.* 55:221, 196.
- [17]http://www-chem.ucdavis.edu/groups/smith/research/porph_func/WebPF1.html
(Recuperado el 16-junio del 2015)
- [18] Rodríguez Suarez, Santiago., García morillo, Salvador., Gómez-Morales, Luis., Romero-Rodríguez, Nieves., Belthan-Romero, Luis., González-Estrada, Aurora. (2011). Porfirina variegata y fibrilación auricular, ataque agudo inducido por propaferona. *Rev clínica Esp Cardio*, 65(05), 1-2. Recuperado el 26 de abril del 2015 de: <http://www.revespcardiol.org/es/porfiria-variegata-fibrilacion-auricular-ataque/articulo/90123839/>
- [19] K. Jacob, T.Demant. (1998). Diagnostik and klinik der porphyrien. *Münch, med. Wschr.* 140, 28/52-33/57
- [20] Noval Menéndez, J., Campoamor, M.T., Laborda, B., López-Colina, G. (2012). Porfiria aguda intermitente y ácido valproico. *Rev Clínica Esp*, 212 (4), 1-2. Recuperado el 27 de abril del 2015 de: <http://www.revclinesp.es/en/porfiria-aguda-intermitente-acido-valproico/articulo/S0014256511004723/>
- [21] Miale, JB. (1985). *Hematología, medicina del laboratorio*. Barcelona: Reverté,
- [22] Davis JR, Andelman SL. (1967). Urinary Delta-Aminolevulinic Acid (ALA) Levels in Lead Poisoning. *Arch Environ Health*, 15, 53-59.
- [23] Walji H. (2007). *Vitamins, Minerals and Dietary Supplements*. 3ª Edición. España: Editorial DAF, S. L.
- [24] Farde L, Nordström AL, Wieser FA, Pauli S, Halldin C, Sedvall G. (1992). Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. *Arch Gen Psychiatry*. 49, 538-544.
- [25] Abraham G., Manlinos F. and Garza R. (1977). *Handbook of radioimmunoassay*. Abraham G (eds) Marcel Dekker, Inc. New York
- [26] Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR. (2001). Longitudinal effect of aging on serum total and the testosterone levels in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 724-31.
- [27] Yosseff, N, David R. (1975). Early diagnosis of congenital adrenal hyperplasia by measurement of 17 α -OH Progesterone. *Clin Endocrinol*, 4, 451.
- [28] Granado de la Orden S, Saá Requejo C, Quintás Viqueira A. (2006). Situación epidemiológica del cáncer de próstata en España. *Actas Urol Esp*; 30, 574-82.

Bibliografía

- [29] Bussemakers, M.J.G., A. Van Bokhoven, G.W. Verhaegh, F.P. Smit, H.F.M. Karthaus, J.A. Schalken, F.M.J. Debruyne, N. Ru, and W.B. Isaacs. (1999). DD3: A New Prostate-Specific Gene Highly Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Res.* 59:5975-5979. [19]
- [30] Ángel C, Ángel M. (2006). *Interpretación clínica del laboratorio*. 7ª edición. Bogotá: Editorial Médica Panamericana. p.13.
- [31] Lund A. (1950). Simultaneous fluorimetric determination of adrenaline and noradrenaline in blood. *Acta Pharmacol Toxicol*; 6: 137-46.
- [32] Gil Monte P, Peiro J. Validez Factorial del Maslach Burnout Inventory. (1999). En una muestra multiocupacional. *Psicothema*; 11(3):679-89
- [33] Pisano, J. J. (1960). *Clin. Chim*, 5, 406.
- [34] Corcoran, A. C.; Taylor, R. D.; Page, I. H. J. (1949). *Am. Med. Ass.* 139, 655-663.
- [35] Hande KR. Carcinoid syndrome. In: Goldman L, Schafer AI, eds. *Goldman's Cecil Medicine*.
- [36] García García, B., Gómez del Campo Dechado, A., Gilarranz Suárez, M., Ariibas Martin, F. (2003). Evaluación de un nuevo método espectrométrico para la medición de la concentración de ion litio en suero. *Química Clínica*, 22 (5), 388-391.
- [37] Chapoteau E, Czech BP, Zazulak W, et al. First colorimetric assay of lithium in serum. (1992). *Clin Chem.* 9, 1654-1657
- [38] Young DS. (1990). *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Test*. 3º ed. Washington: AACC Press.
- [39] ASA (2010). Handbook of andrology. The American Society of Andrology (ASA) (2ª Edición Marzo 2010).
- [40] <http://quimeras.tech-gamers.pt/percentagem-elevada-de-espermatozoides-anormais/> (Recuperado el 19 de mayo del 2015)
- [41] Capek K. (1923). *Rossum's Universal Robots*. Playfair N., Server P., trans. Landes W.A., ed New Cork: Doubleday.