

---

# BIOQUÍMICA ANALÍTICA I CLÍNICA

---



CIÈNCIES BIOMÈDIQUES UB - PRIMAVERA 2017

ALBERT TORELLÓ PÉREZ

---

# Índex

<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Variabilitat Clínica</b>	<b>1</b>
	Mesura o determinació — 1	
<b>2</b>	<b>Semiologia</b>	<b>5</b>
	Valors de referència — 5 • Determinació de la capacitat discriminant — 5	
<b>3</b>	<b>Proteïnes plasmàtiques</b>	<b>7</b>
	Proteïnes plasmàtiques de transport — 7 • Proteïnes de fase aguda — 8 • Altres proteïnes — 9 • Determinació de la proteïna total — 10 • Interpretació clínica — 12 • Fraccionament de proteïnes — 12 • Mètodes immunològics per la detecció de proteïnes — 14	

---

# I. INTRODUCCIÓ

---

## 1. Variabilitat Clínica

En les proves analítiques hi ha un rang de variabilitat, ja sigui per assumptes purament tècnics o estil de vida dels pacients (fumadors, ingesta de medicaments...).

Els paràmetres que s'analitzen s'anomenen magnituds bioquímiques d'un sistema. El sèrum i la orina són els principals fluids fisiològics que s'analitzen.

### 1.1 Mesura o determinació

Conjunt d'operacions que permeten donar un valor a una magnitud bioquímica concreta d'un sistema.

La mostra s'anomena espècimen, que és la porció de material original especialment seleccionada, provinent d'un sistema dinàmic, i que en el moment d'obtenir-lo s'assumeix que es representatiu del material original.

La variabilitat d'una determinació pot provenir de diferents fonts:

- Preanalítica o premetrològica: Presa de la mostra, conservació, transport. Són extra-analítiques.
- Biològica
- Iatrogènica: Relacionada amb el seguiment d'un tractament mèdic.
- Analítica i extraanalítica: És la que depèn del procés purament analític, de la tècnica i instrument.
- Postanalítica: Interpretació del resultat, confondre les mostres...

#### 1.1.1 Variabilitat premetrològica

- Postura: En una posició erecta varia el volum de sang, ja que el líquid passa a l'espai intersticial. Augmentarà la concentració d'algunes magnituds.
  - Augmenta més un 5% la concentració d'albúmina, Fe, colesterol, fosfatasa àcida i fosfatasa alcalina.
  - Disminueix el Na, el K, el Ca, el Pi, la urea i la creatinina.
  - Augmenten hormones com les catecolamines, l'angiotensina, la renina, aldosterona, ADH

Els ions passen més fàcilment per l'espai intersticial.

- 
- Si el temps de torniquet és molt gran es genera hipòxia (amb l'acidosi corresponent). Pot comportar dilatació venosa, i augmenta l'albúmina, colesterol, AST. L'acidosi es produeix per l'acumulació de CO<sub>2</sub> en sang.
  - Hemòlisi: Alteració colorimètrica. Pot provocar uns valors alts de potassi. És important centrifugar la sang per aïllar el sèrum.
  - Temps fins a l'analítica.
    - El Na i el K separats d'hematies són estables fins a 7 dies en sèrum.
    - Glucosa: utilitzar un inhibidor de la seva degradació, com el NaF.
    - La fosfatasa alcalina és estable uns 7 dies a 4°C però la fosfatasa àcida no ho és.

L'exercici varia les magnituds bioquímiques de la següent manera:

- **Exercici moderat**

- Augmenta la glucosa, la insulina i el cortisol.
- Baixa el pH, el CO<sub>2</sub> en sang arterial però no en sang venosa.
- Augmenta la concentració plasmàtica d'enzims musculars, com la creatina quinasa o la LDH (degut al microtrencament de fibres musculars).

- **Exercici intens**

- Disminució del volum plasmàtic
- Augment proteïnes plasmàtiques
- Augmenta la renina
- Disminueixen els TAG.
- Augmenten els àcids grassos lliures

- **Atletes amb valors**

Els viatges alteren els resultats per l'estrès i les alteracions dels ritmes circadians:

- ACTH, cortisol, GH, prolactina, TSH
- Disminueixen les proteïnes sèriques a la nit (per la postura)
- Cicle menstrual: alteració estrògens, andrògens, prolactina, progesterona, colesterol, creatinina, ions...
- Pel que fa a les estacions, la sudoració o la deshidratació concentren els components plasmàtics.

L'alimentació varia:

- 
- A la post-ingesta, augmenten els TAG i s'ha d'esperar fins a 12h, si s'ingereixen proteïnes augmenta la urea. Després de menjar, en general sempre augmenta la glucosa i s'ha d'esperar unes 6h.
  - Les dietes vegetarianes donen alcalosi, ja que les verdures i les fruites tenen lactat i citrat que es degraden a  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{OH}^-$ . La malnutrició i el dejuni causen la disminució de proteïnes plasmàtiques.
  - La obesitat augmenta el colesterol.
  - La ingesta d'alcohol provoca l'augment de la gamma glutamil transferasa i de la glucosa.
  - Tabac: Augmenta el CO, les catecolamines i el colesterol.
  - La cafeïna augmenta els TAG, cortisol i àcids grassos lliures.

La febre augmenta la insulina i el glucagó.

### 1.1.2 Variabilitat iatrogènica

Degut a tractament farmacològic del pacient. Poden produir la síntesi d'enzims, inhibeixen enzims, competeixen per la unió a proteïnes de transport.

Els opiacis augmenten la concentració plasmàtica d'enzims hepàtics.

Els diürètics tenen efectes diferents segons el tipus, però alteren la concentració d'ions i augmenten la glucosa i els compostos nitrogenats.

L'efecte depèn de la dosi del fàrmac, la durada del tractament i les característiques del pacient.

També hi pot haver variabilitat deguda a accions mèdiques. La hospitalització:

- Fins a 4 dies, disminueix el volum extracel·lular i augmenta l'hematòcrit.
- Més de 4 dies: hi ha retenció de fluids i excreció de Ca, Na i Pi (degut a la resorció òssia).

Cal fins a 3 setmanes per tornar a valors normals.

Hi pot haver errors d'identificació de la mostra o del pacient i de transcripció.

### 1.1.3 Variabilitat biològica intraindividual

Deguda a:

- Polimorfismes genètics
- Edat
- Gènere
- Raça

- 
- Factors ambientals com l'altitud o la temperatura
  - Estació
  - Cicle menstrual

També és important la variació circadiana.

### 1.1.4 Variabilitat metrològica

És conseqüència del protocol de determinació i dels aparells de mesura. L'interval analític és l'interval de concentració en què es pot aplicar el mètode analític.

**Precisió** És una mesura de si diferents determinacions d'un mateix paràmetre i en un mateix espècimen donen o no resultats concordants.

- Imprecisió: Desviació estàndard d'un grup de mesures repetides.

**Exactitud** És una mesura de si la determinació d'un paràmetre en un espècimen dona o no un valor proper al real.

- Inexactitud: Diferència entre la mitjana d'un grup de mesures repetides i el valor real.
- Límit de detecció: Resultat aïllat més petit que es pot distingir, amb certa probabilitat, d'un valor del blanc o valor de fons.

**Interferència** Efecte d'un component del propi espècimen o afegit (reactiu, conservant, diluent) que no produeix lectura sobre si mateix (vs Blanc) sobre l'exactitud de la mesura d'un component d'interès. És difícil d'evitar i cal minimitzar (sacàrids en la determinació de glucosa).

### 1.1.5 Variabilitat post metrològica

Deguda a:

- Transcripció de resultats
- Elaboració de l'informe
- Emissió de l'informe
- Interpretació de l'informe

### 1.1.6 Variabilitat patològica

Poden provocar canvis en una magnitud bioquímica. Variació superior a la variabilitat intraindividual.

La magnitud bioquímica alterada té valor semiològic si és produïda per un o pocs estats patològics.

---

## 2. Semiologia

### 2.1 Valors de referència

La població de referència és la població individus sans (normals). Per estudiar-ho, s'agafa una mostra de referència, que és un nombre assequible i representatiu de la població de referència.

**Valors de referència** Rang de resultat analític de la determinació d'un paràmetre bioquímic en espècimens d'individus de referència.

**Capacitat discriminant** Propietat de donar valors diferents en individus d'una població normal ( $\hat{E}$ ) respecte els d'una població patològica ( $E$ ).

### 2.2 Determinació de la capacitat discriminant

La capacitat discriminant es mesura amb:

- **Sensibilitat:** Probabilitat d'obtenir un resultat positiu en un individu de  $E$  (malalt).

$$\frac{PC}{PC + NF} \quad (1)$$

On  $PC$  són els positius certs i  $NF$  els negatius falsos. Seria el nombre de malalts detectats entre els malalts totals.

- **Especificitat:** Probabilitat d'obtenir un resultat negatiu en un individu de  $\hat{E}$  (encertar amb un sa).

$$\frac{NC}{NC + PF} \quad (2)$$

On  $NC$  són els negatius certs i  $PF$  els positius falsos. Seria el nombre de sans detectats entre els sans totals.

- **Eficàcia diagnòstica** És el quocient d'individus classificats correctament en la població de malalts ( $E$ ) o de sans ( $\hat{E}$ ) respecte el total de la mostra:

$$\frac{PC + NC}{PC + NF + NC + PF} \quad (3)$$

- **Valor predictiu** És la probabilitat de patir la malaltia quan el resultat és positiu i de no patir-la quan el resultat és negatiu.

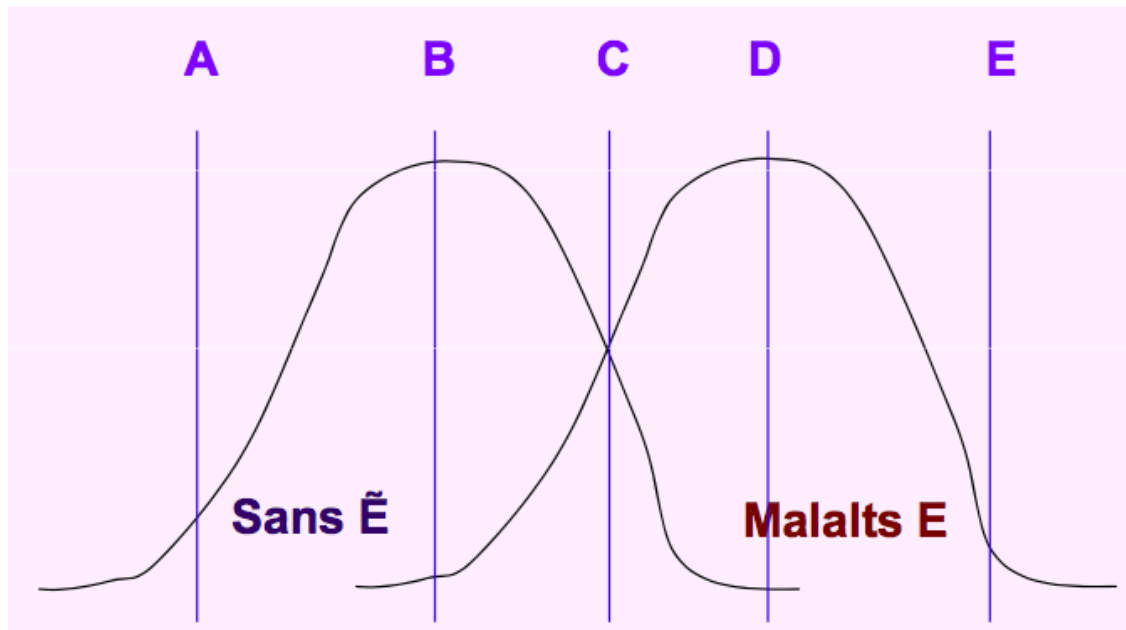
- Positiu: Probabilitat de patir-la si el diagnòstic és positiu:

$$\frac{PC}{PC + NF} \quad (4)$$

- Negatiu: Probabilitat de patir-la si el diagnòstic és negatiu:

$$\frac{NC}{NC + NF} \quad (5)$$

## Exemple



- En A la sensibilitat és màxima (1) i l'especificitat és mínima (0)
- En B la sensibilitat és màxima (0.95) i l'especificitat és 0.5.
- En C la sensibilitat és 0.76 i l'especificitat és 0.75.
- En D la sensibilitat és 0.5 i l'especificitat és 0.95.
- En E la sensibilitat és mínima (0) i l'especificitat és màxima (1)



---

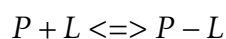
## 3. Proteïnes plasmàtiques

Hi ha 4 grans grups de proteïnes plasmàtiques:

- Transport: Sobretot de molècules hidrofòbiques. La majoritària és l'albumina.
- Reactants de fase aguda
- Complement
- Immunoglobulines

### 3.1 Proteïnes plasmàtiques de transport

Aquests sistemes estan en equilibri:



Per ser efectiu, el lligand ha d'anar lliure en plasma (sense unió a proteïnes). Quan augmenta la concentració de proteïna transportadora, augmenta la concentració de complex proteïna-lligand i disminueix la quantitat de lligand lliure a la sang.

La tiroxina es transporta unida a albumina o a una proteïna específica com la TBP.

Les proteïnes plasmàtiques s'analitzen segons el patró d'electroforesi. Les proteïnes que tenen un pI proper a 7 tenen poca mobilitat. Si tenen un pI més baix (6) ja corren més al gel. L'albumina té un pI molt baix i corre molt, la prealbumina encara té un pI més baix. La manera de distingir les proteïnes és mitjançant la revelació amb anticòs.

Per separar proteïnes segons el pI es fa electroforesi en un suport d'acetat de cel·lulosa i per separar per pes molecular es fa SDS-PAGE.

La **prealbumina** és una proteïna de síntesi hepàtica de 55 kDa rica en Trp. Transporta T3 i T4; tot i que hi ha proteïnes específiques com la TBP. Té una concentració mitjana de 0.1-0.4 g/L i una vida mitjana curta. Es determina per immunoassaig.

L'**albumina** contribueix a la pressió osmòtica de la sang ja que és la proteïna més abundant (40-60%) i és de síntesi hepàtica amb uns 66 kDa. Les principals funcions són el transport d'àcids grassos, bilirrubina, hormones sexuals, cortisol... Té una vida mitjana alta en plasma (15-19 dies). La hiperalbuminèmia és símptoma de deshidratació. La hipoalbuminèmia pot ser símptoma de malabsorció d'aminoàcids o de malnutrició (síndrome de te i torrada), disfunció hepàtica, alcoholisme, inflamació crònica o lesió tissular.

La hiperhidratació és característica perquè produeix edemes en extremitats, p.e.

Es determina fent precipitar les globulines amb sulfat d'amoni i després determinant la concentració de proteïna total. Per precipitar les globulines s'afegeix un 40% de sulfat d'amoni i amb un 70% es precipiten totes les proteïnes. El sulfat d'amoni és molt soluble en aigua. Es pot determinar per la reacció amb colorants (verd de bromocresol), amb el problema que un % d'albumina no reacciona amb el colorant.

---

La composició del líquid intersticial és similar a la de la sang, exceptuant les proteïnes que són massa grosses en general per passar l'endoteli.

La pressió osmòtica exercida per les proteïnes del plasma compensen la pressió sanguínia dels vasos i manté els vasos plens de líquid.

Altres proteïnes de transport són la **RBP** (proteïna fixadora de retinol), una proteïna de 21 kDa. Baixos nivells de RBP s'expliquen per un dèficit de Zn.

La **transferrina** és una proteïna de 77 kDa que transporta  $\text{Fe}_3^+$ . Nivells alts de transferrina indiquen anèmia, ja que l'organisme busca compensar el dèficit de Fe.

## 3.2 Proteïnes de fase aguda

Són les proteïnes que canvien de concentració en processos inflamatoris (augmenten més d'un 25%). La variació es produeix abans que hi hagi símptomes clínics clars. La majoria són de mobilitat  $\beta$  en una electroforesi. Són unes 30 proteïnes de síntesi hepàtica. Hi ha proteïnes de fase aguda negatives (disminueixen quan hi ha infecció, que són l'albumina, RBP, transferrina) i positives (augmenten quan hi ha infecció).

Hi ha 2 proteïnes de fase aguda positives importants:

- **Proteïna C reactiva:** Té una mobilitat electroforètica entre beta i gamma. Els seus nivells augmenten 2000 vegades en una infecció. Diagnòstic d'infeccions inespecífic, artritis reumatoide, lupus, leucèmia, postoperatori. S'uneix a la paret bacteriana, membrana de fongs... Activa el sistema del complement.
- **$\alpha$  antitripsina:** Té mobilitat  $\alpha$ . Gran contingut en carbohidrats. Inhibeix moltes proteases, com la tripsina, la elastasa o la trombina. Es coneixen 33 variants genètiques. Baixos nivells indiquen diagnòstic de pèrdua severa de proteïnes i en síndrome d'estrès respiratori del nou-nat. El dèficit congènit comporta alteracions pulmonars (emfisema per la proteòlisi d'elastina) i hepàtic (cirrosi per acumulació de proteïnes al fetge).
- La **ceruloplasmina** uneix ions de Cu i protegeix de la seva toxicitat. Augmenta en traumatismes i en la obstrucció biliar.

<b>Grup III x1000</b>	<b>[normal]</b>	<b>[inflamació]</b>	<b>Temps resposta (h)</b>
Proteïna C reactiva	0.0008-0.008	0.4	6-10
30-65	64-76	69-74	6-10

<b>Grup II x2-4</b>	<b>[normal]</b>	<b>[inflamació]</b>	<b>Temps resposta (h)</b>
$\alpha$ 1-antiquimiotripsina	0.3-0.6	3	10
$\alpha$ 1-antitripsina	0.78-2	7	?
$\alpha$ 1-glicoproteïna àcida	0.5-1.4	3	24
Haptoglobina	1-3	6	?
Fibrinogen	2-4	10	?

TAULA 1: Concentració de proteïnes de fase aguda (g/L)

### 3.3 Altres proteïnes

#### 3.3.1 Immunoglobulines

La IgG és la majoritària, al voltant del 70-75% i és una proteïna de 160 kDa.

Les IgA representen un 10-15% de les immunoglobulines i n'hi ha 2 classes. Es secreta en llàgrimes, suor, saliva, llet, bronquis i gastrointestinal i és més resistent a la degradació enzimàtica (contra virus i bacteris).

Les IgM representen un 5-10% de les immunoglobulines i estan al voltant dels 900 kDa.

Hi ha menys d'1% d'IgD i la IgE activa la secreció d'histamina (vasoactiu).

Quan disminueixen les immunoglobulines, pot ser per pèrdua de proteïnes general, dèficit en la síntesi o alteracions congènites.

Augmenten quan hi ha infeccions o en el cas de malalties autoimmunitàries.

Pel que fa als diferents tipus d'immunoglobulines

- Augmenten IgG en les respostes autoimmunes (especialment), hepatitis,...
- Augmenten IgA en les infeccions pell, budell, respiratori, renal...
- Augmenten IgM en les infeccions víriques i de la sang
- Augmenten IgE en l'asma, les al·lèrgies...

#### 3.3.2 Proteïnes del complement

Són un conjunt de 20 proteïnes diferents de síntesi hepàtica. Poden interaccionar seqüencialment amb complexos Ag-Ab i membranes cel·lulars per destruir virus i bacteris. Activades provoquen alliberament histamina (permeabilitat vascular) i agregació plaquetària.

---

Baixos nivells de proteïnes del complement poden indicar:

- Malnutrició hepàtica
- Glomerulonefritis
- Lupus
- Artritis reumatoide
- Septicèmia

Altres proteïnes plasmàtiques són:

- Inhibidores de proteases
- Ferritina
- Mioglobina: Augmenta en cardiopaties, infart agut...
- Lisozima: Augmenta en tuberculosi, leucèmia...

### 3.4 Determinació de la proteïna total

Hi pot haver interaccions en l'índex de refracció si hi ha interferència per alts nivells de glucosa i colesterol.

El reactiu de Biuret fa reaccionar grups amino i enllaços peptídics en medi alcalí donant color violeta. Poden interferir la hemòlisi o terbolesa del medi (extracció amb èter).

El reactiu de Folin-Löwry fa reaccionar el fosfomolibdat amb aminoàcids aromàtics com Phe, Tyr o Trp que dona color blau. És molt més sensible que el Biuret.

Es pot fer servir sense cap colorant, mesurant l'absorbància en l'espectre UV. Aquests mètodes són:

- Warburg i Christian mesuren A 260 i 280 nm. Cal tenir en compte que els àcids nucleics absorbeixen a 260 nm i s'ha de corregir aquest possible efecte. La concentració en [mg/mL] s'obté  $factor \cdot A_{260}$ .
- El mètode Whittaker i Granum corregeix a 235 nm, ja que hi ha tampons que absorbeixen a 235 nm.

<i>Assay</i>	<i>Range</i>	<i>Comments</i>
Absorbance 280 nm	0.1–3 mg	Affected by aromatic content of protein and by some absorbing detergents, e.g. Tritons. Generally gives only rough estimate.
Absorbance 212 nm	1 µg–1 mg	Depends on absorbance by peptide bond, therefore sensitive and relatively invariable, <i>but</i> subject to substantial interference (e.g. acids).
(Micro) Biuret	0.1–1 mg	Employs peptide bond therefore little variation with protein composition. Turbidity in detergents can be reduced with 1,2-propanediol (82).
Bradford	1–100 µg	Some variation with protein composition since relies on interaction with amino groups. Detergents can interfere. Variants on this scheme could be more sensitive or useful in some cases (83).
[ <sup>3</sup> H]Dansyl chloride	0.1–1 µg	Reactive with amines, phenols, thiols and imidazoles. Sensitive but slow and complex procedure. Some detergents can interfere (84).
Fluorescamine	0.1–50 µg	Fluorescent on reaction with primary amines under alkaline conditions. Relatively free of interference, simple procedures, rapid results (Roche).
(Micro) Lowry	1–50 µg	Some variability with proteins, interfering detergents can be solubilized by SDS (79).
Manual ninhydrin	1–50 µg	No protein variability since proteins are degraded to amino acids. High levels of detergents can interfere. Time consuming (77).
BCA (Pierce)	0.5–50 µg	Very sensitive, easy to use and relatively free from interference.

FIGURA 1: Assajos per la determinació de proteïna

Un mètode molt usat actualment és el BCA, que és molt sensible.

### 3.5 Interpretació clínica

[Prot. total] (g/L)			[Albúmina] (g/L)		
Edat	Dones	Homes	Edat	Dones	Homes
18-30	66-77	70-78	18-30	42-50	46-50
30-65	64-76	69-74	30-50	41-48	42-49
			50-65	40-48	41-49

Transferrina	Prealbúmina	RBP
1.3-4	0.1-0.4	0.035-0.09

	IgG Resposta autoimmune	IgA Infecció pell, renal..	IgM Inf. vírica, malària..	IgE Al·lèrgies (kUI/L)
0-4 dies	7.0-14.8	0-0.033	0.05-0.3	
16-60 anys	6.5-15	0.76-3.9	0.4-3.45	0-380
> 60 anys	6.0-15.6	0.90-4.1	0.3-3.6	
Líquid CSF	0-0.055	0-0.006	0-0.013	
Saliva		0.11		

FIGURA 2: Concentració de proteïnes en plasma

Les causes d'un **augment** de proteïna total:

- Deshidratació o aplicació de torniquets
- Paraproteïnèmia: Augment de globulines, bàsicament.
- Processos inflamatoris crònics

Les causes d'una **disminució** de la proteïna total:

- Sobrehidratació
- Pèrdua de proteïnes per síndrome nefròtica
- Síntesi deficient per l'aportació dietètica (Kwashiorkor, degut a una dieta pobre en proteïnes per un deslletament precoç), malabsorció severa i hepatopatia.

### 3.6 Fraccionament de proteïnes

- Fraccionament salí amb sulfat d'amoni.
- Fraccionament amb etanol
- Mètodes cromatogràfics (líquid-líquid o HPLC)
- Electroforesi

- En acetat de cel·lulosa es separen les proteïnes per pI i es tenyeix amb negre amido.
- En PAGE, com que s'afegeix SDS les proteïnes migren per mida. Es tenyeix amb blau de Coomassie.

El gel d'electroforesi es quantifica per densitometria. L'àrea per sota de cada pic és proporcional a la quantitat de proteïna. Es poden quantificar l'albumina i les globulines  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ .

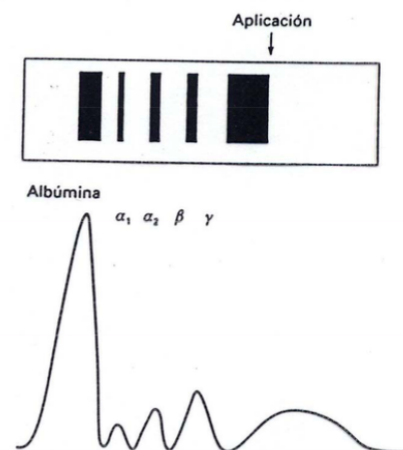


FIGURA 3: Separació de proteïnes del sèrum per electroforesi en acetat de cel·lulosa

Fracció	%	[ ] g/dL
Albumina	53.0-67.0	3.2-5.0
Globulines $\alpha_1$	2.5-5.0	0.1-0.4
Globulines $\alpha_2$	7.0-13.0	0.6-1.0
Globulines $\beta$	9.0-14.0	0.6-1.3
Globulines $\gamma$	10.0-21.0	0.7-1.5

FIGURA 4: Percentatges i concentracions de referència de les fraccions proteiques separades per electroforesi en acetat de cel·lulosa

### 3.6.1 Patrons electroforètics anòmals

- **Hiperproteïnèmia:** pèrdua d'intensitat de bandes (més acusat per l'albumina)
- **Síndrome nefròtic:** es perden les proteïnes de baix pes molecular i es conserven les d'alt pes molecular
  - Disminueixen l'albumina i les  $\gamma$ -globulines.
  - Augmenten les  $\alpha_2$ -globulines
- **Proteïnúria tubular:** Degut a trastorns renals tubulars que comporten pèrdua de proteïnes. Disminueixen  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -globulines.
- **Cirrosi:** Augmenta  $\gamma$ -globulines i disminueix l'albumina (dany hepàtic)

- 
- **Reactants de fase aguda:** Augmenten les  $a_1$  (antitripsina i glicoproteïna àcida) i les  $a_2$  (haptoglobina).
  - **Dèficit de Fe:** Augmenta les  $b_1$  (transferrina).
  - **Hipergammaglobulinèmies:** Augmenten les bandes específiques en regió  $\gamma$  corresponent als Abs monoclonals. Es dona en processos inflamatoris, virals, ...
  - **Paraproteinèmies:** Apareixen bandes molt definides com en el mieloma múltiple o la macroglobulinèmia de Waldenström.

### 3.7 Mètodes immunològics per la detecció de proteïnes

Es basa en anticossos contra una proteïna en concret.

- Immunodifusió radial /simple o doble en gel d'agarosa
- Immunolectroforesi
- Immunoturbidimetria: sèrum + Ac específic a 420 nm
- Nefelometria: sèrum + Ab específic (lectura de llum refractada 90°)
- Immunoassaig radioactius o enzimàtics (RIA, ELISA)