
BIOQUÍMICA ANALÍTICA I CLÍNICA



CIÈNCIES BIOMÈDIQUES UB - PRIMAVERA 2017

ALBERT TORELLÓ PÉREZ

Índex

1	Variabilitat Clínica	2
	Mesura o determinació — 2	
2	Semiologia	6
	Valors de referència — 6 • Determinació de la capacitat discriminant — 6	
3	Proteïnes plasmàtiques	8
	Proteïnes plasmàtiques de transport — 8 • Proteïnes de fase aguda — 9 • Altres proteïnes — 10 • Determinació de la proteïna total — 11 • Interpretació clínica — 13 • Fraccionament de proteïnes — 13 • Mètodes immunològics per la detecció de proteïnes — 15	
4	Hemoglobina i ferro	16
	La hemoglobina — 16 • Trastorns deguts a reaccions de l'hemoglobina — 17 • Trastorns a la síntesi de la globina — 18 • Desordres de la síntesi del grup hemo — 21 • Alteracions del metabolisme del ferro — 27 • Casos clínics — 30	
5	Enzimologia clínica	31
	Enzims — 31 • Estratègies bioquímiques per l'estudi clínic del metabolisme — 33 • Enzims marcadors habituals en enzimologia clínica — 34	

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_2 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 CO₂ 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 CO_2 i H_2O i 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.

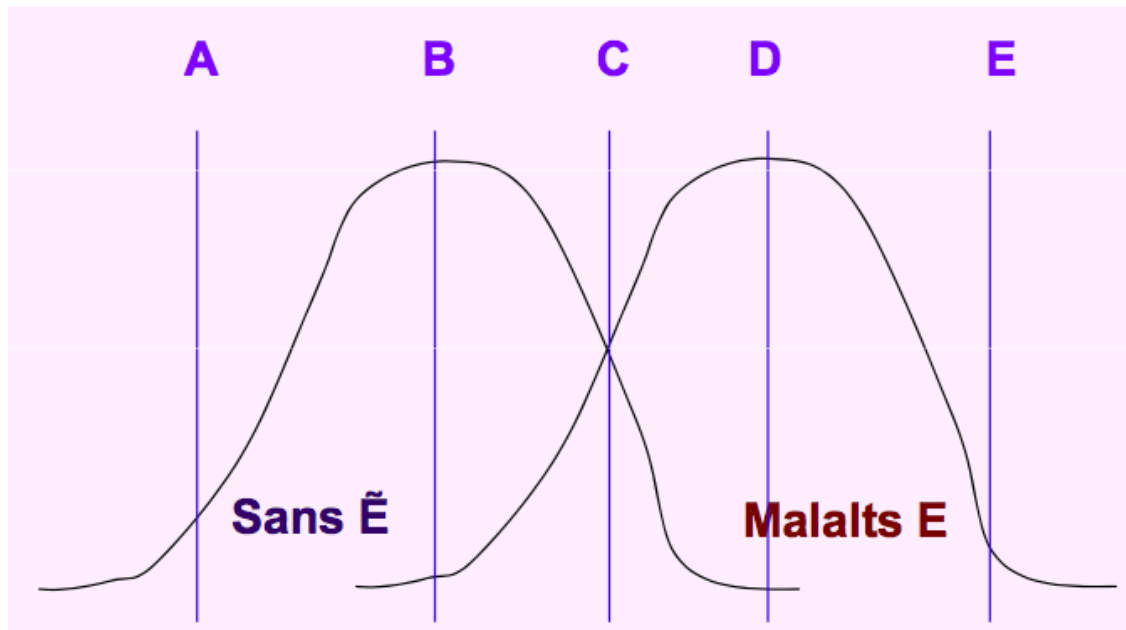
- Positiu: Probabilitat de patir-la si el diagnòstic és positiu:

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

- 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)

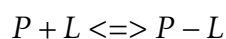
3. Proteïnes plasmàtiques

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 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 β 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.
- **α antitripsina:** Té mobilitat α . 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.

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

Grup II x2-4	[normal]	[inflamació]	Temps resposta (h)
α 1-antiquimiotripsina	0.3-0.6	3	10
α 1-antitripsina	0.78-2	7	?
α 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).
[³ 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 α , β i γ .

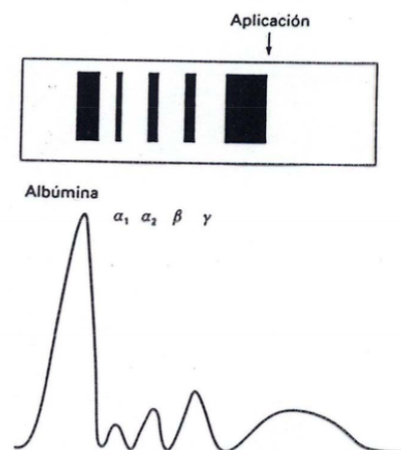


FIGURA 3: Separació de proteïnes del sèrum per electroforesi en acetat de cel·lulosa

Fracció	%	[] g/dL
Albumina	53.0-67.0	3.2-5.0
Globulines α_1	2.5-5.0	0.1-0.4
Globulines α_2	7.0-13.0	0.6-1.0
Globulines β	9.0-14.0	0.6-1.3
Globulines γ	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 γ -globulines.
 - Augmenten les α_2 -globulines
- **Proteïnúria tubular:** Degut a trastorns renals tubulars que comporten pèrdua de proteïnes. Disminueixen α , β i γ -globulines.
- **Cirrosi:** Augmenta γ -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 γ 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)

4. Hemoglobina i ferro

4.1 La hemoglobina

La hemoglobina és una proteïna globular que dona la coloració vermella de la sang. Responsable del transport de O₂. Té un pes de 64,45 kDa.

Els nivells normals són de 16g/100 mL en homes i de 14g/100 mL en les dones.

Un home de 70 kg té 900 g d'hemoglobina. El bescanvi d'hemoglobina és de 0,3 g/h (sintetitzats i destruïts).

Classificació de les malalties relacionades amb la hemoglobina:

- Reaccions de l'hemoglobina
 - Metahemoglobinèmia hereditària
- Síntesi de la globina
 - Hemoglobinopaties estructurals
 - * Anèmies drepanocítiques
 - * Metahemoglobinèmia congènita
 - * Eritrocitosis (alterada afinitat per O₂)
 - Talassèmies (hemoglobines alterades)
 - * α -talassèmies
 - * β -talassèmies
- Síntesi i degradació del grup hemo
 - Porfíries agudes
 - * Porfíria aguda intermitent
 - * Coproporfíria hereditària
 - * Porfíria variegata
 - Porfíries no agudes
 - * Porfíria eritrohepàtica (eritropoiètica)
 - * Porfíria eritropoiètica congènita
 - * Porfíria congènita (Intoxicació per plom)
- Alteracions del metabolisme del ferro
 - Anèmia ferropènica (manca de ferro)
 - * Pèrdua crònica de sang
 - * Ingesta inadequada de ferro
 - Anèmia sideroblàstica (mala utilització del ferro)
 - Hemocromatosis (sobrecàrrega de ferro)

4.1.1 Estructura

Hi ha 6 tipus de globines, que en la seva combinatòria generen els diferents tipus d'hemoglobina que trobem en humans. Aquests tipus són: α , β , γ , δ , ϵ , ζ .

La hemoglobina és un heterotetràmer $\alpha_2\beta_2$ en adults. Presenta cooperativitat amb l'oxigen. També té al·lostèrisme amb el 2,3-difosfoglicerat, un intermediari de la glicòlisi que només es troba en eritròcits. Això facilita l'alliberació d'oxigen als teixits.

Es sintetitza als reticulòcits (eritròcits immadurs).

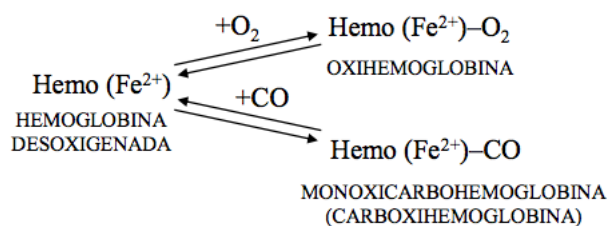
La hemoglobina presenta diferents subunitats segons l'estadi de desenvolupament de l'individu:

- Adult:
 - Hemoglobina A1 ($\alpha_2\beta_2$)
 - Hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$)
- Fetal: Cadenes $\alpha_2\gamma_2$
- Embrió:
 - Gower I: $\zeta_2\epsilon_2$
 - Gower II: $\alpha_2\epsilon_2$
 - Portland: $\zeta_2\gamma_2$

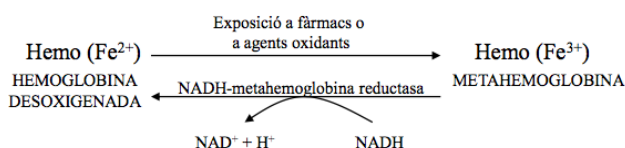
Hi ha 2 loci d' α -globina al cromosoma 16 i un locus de β -globina al cromosoma 11.

4.2 Trastorns deguts a reaccions de l'hemoglobina

La carboxihemoglobina presenta menys afinitat per l'hemoglobina.



Molt fàrmacs o agents oxidants poden provocar la formació de metahemoglobina (amb Fe_3^+), que mitjançant la NADH-metahemoglobina reductasa la torna a reduir.



La metahemoglobinèmia hereditària és una deficiència en NADH-metahemoglobina reductasa. El Fe del hemo s'oxida en 25 % a Fe_3^+ . Es manifesta amb cianosi (coloració fosca

a la pell). Es tracta amb fàrmacs que redueixin la metahemoglobina. És una malaltia molt greu.

4.3 Trastorns a la síntesi de la globina

4.3.1 Hemoglobinopaties estructurals

Les mutacions perjudicials desapareixen, però les altres poden sobreviure (els heterozigots resisteixen més que els homozigots). Algunes mutacions són innòcues.

4.3.1.1 Hemoglobina S. Anèmia drepanocítica

Es dona un canvi d'aminoàcid Glu->Val a la cadena beta. És insoluble a baixes pressions de O₂. Els glòbuls vermells presenten una morfologia falciforme. Quan està desoxigenada, la hemoglobina es polimeritza i es deformen els eritròcits. Els heterozigots presenten poques vegades símptomes greus

Es va originar a Àfrica i confereix resistència a la malària. La presenten un 40 % de la població africana i un 10% dels negres americans.

La Hb pot polimeritzar formant fibres de 3000 Å. Hi ha cicles successius de forma de falç i normal. La forma de falç es trenca als capil·lars per falta de flexibilitat. L'anèmia s'agreuja amb oxidants.

Altes concentracions d'HbS d'afinitat baixa per O₂ no donen cap problema fins l'administració d'un agent oxidant.

L'anèmia és menys severa si és dependent d'HbF. Els pacients tendeixen a augmentar la proporció d'HbF en l'adult. Els homozigots d'Orient Mitjà són asimptomàtics ja que tenen un 18% d'HbF.

El diagnòstic es fa per electroforesi de la hemoglobina o per examen microscòpic d'un frotis de sang.

Encara no hi ha tractament, encara que hi ha fàrmacs en estudi. La profilaxi es basa en una bona nutrició i higiene, contra la malària. En cas d'infecció, s'actua sobre l'agent infecciós. Si es fa una transfusió quan es dona la primoquina ja que és oxidant i es pot agreujar l'anèmia.

4.3.1.2 Hemoglobinopaties inestables

S'han descrit més de 100 hemoglobinopaties. Es produeix la formació de cossos d'inclusió intraeritrocítics (cossos de Heinz), que són precipitacions d'hemoglobina. Consisteix en una sèrie de petites granulacions que se situen a la perifèria dels hematies. Es produeix en malalties congènites.

Hemoglobina	Posicions de la cadena β de la hemoglobina									
	1	2	3	6	7	26	63	67	121	146
A (normal)	Val	His	Leu	Glu	Glu	Glu	His	Val	Glu	His
S (de cèl.lules falciformes)				Val						
C				Lys						
G San José					Gly					
E						Lys				
M Saskatoon							Tyr			
M Milwaukee								Glu		
O Arabia									Lys	

FIGURA 5: Composició parcial en aminoàcids en la cadena β humana normal i algunes hemoglobines amb cadenes β anormals. Altres hemoglobines tenen cadenes α anormals.

4.3.1.3 Eritrocitosis

Alteració en l'afinitat per O_2 . En casos lleus no requereix farmacologia. L'afinitat és més alta degut a canvis que eviten la unió de 2,3-difosfoglicerat. Es produeix una hipòxia lleu (augment d'eritròcits).

4.3.1.4 Metaglobinèmia

Alteració en l'afinitat per O_2 . Augmenta la metaglobulina (que és hemoglobina amb Fe^{3+}). Els eritròcits perden la capacitat de transportar O_2 i produeix cianosis.

Ens podem trobar:

- Metaglobinèmia adquirida: Produïda per fàrmacs, oxidants...
- Metaglobinèmia congènita: Per deficiència de la citocrom-b5-reductasa o en presència d'hemoglobina M.

Hi ha Hb inestables, com la M que s'oxiden molt fàcilment a Fe^{3+} . Hi ha 5 tipus d'hemoglobina M, són mutacions al centre de la unió de la globina al grup hemo. No hi ha afectació en heterozigosi. L'homozigositat hauria de ser letal però no ho és.

Les manifestacions clíniques són:

- Cianosi amb 1.5-2 g d'HbM (malaltia congènita del cor hi ha cianosi amb 5g d'Hb desoxigenada/100 mL).
- Cianosi en el naixement en HbM de cadena alfa.
- Cianosi als 6 mesos si el defecte està en beta.
- És convenient fer el diagnòstic per descartar cianosi d'origen cardíac, que és molt greu.

4.3.2 Talassèmies

Són malalties en les que hi ha deficiència de globina, la poca que hi ha és normal. Les causes són:

- Deleció gènica
- Defectes en el processat de RNA
- Mutacions sense sentit
- Mutacions stop

Les β -talassèmies són més greus perquè només hi ha un locus gènic de cadena β -globina.

4.3.2.1 β -Talassèmies

La síntesi de la cadena beta està disminuïda o és nul·la. No està alterada la síntesi de la cadena α .

- β^0 -talassèmia: No hi ha síntesi de cadena β de la globina (augmenta la HbA_2). En homozigots, la HbF i HbA2 està augmentada; tenen anèmia microcítica hipocròmica i els eritròcits tenen mida i forma normals. Els heterozigots són asimptomàtics.
- β^+ -talassèmia: Síntesi de la cadena β disminuïda (augmenta la HbA2). Els homozigots tenen els mateixos símptomes que l'anterior.
- $\delta\beta$ -talassèmia: Síntesi de la cadena β i δ de globina disminuïdes. La gravetat depèn de si està compensada per una síntesi de cadena γ .
- $\gamma\delta\beta$ -talassèmia: No hi ha síntesi de cadena γ i δ i la cadena β està disminuïda.

4.3.2.2 α -Talassèmies

Alterada la síntesi de la cadena α . Es sintetitzen en excés les cadenes γ (hemoglobina de Bart) i les cadenes β (hemoglobina H).

- α^0 -Talassèmia: No hi ha síntesi de la cadena α de globina. La hemoglobina de Bart (tetràmer de δ) representa el 80-90 % de la hemoglobina total. És mortal ja que la HbBart no pot transportar O_2 .
 - Homozigots: Es produeix hidropesia fetal (mort del fetus al 3r trimestre de l'embaràs o a les 24h del part).
 - Heterozigots: Hi ha microcitosis. La hemoglobina de Bart és el 2-20% de tota la hemoglobina i tenen la HbF i HbA2 normals.
- α^+ -Talassèmia: La síntesi de la cadena α està disminuïda. En els nounats la hemoglobina de Bart (δ_4) representa el 5-10% de la hemoglobina.

-
- Homozigots: Tenen microcitosi i anèmia discreta.
 - Heterozigots: És asimptomàtica. No presenten hemoglobina de Bart.
- Hemoglobinopatia H: Els nounats tenen més del 5% de la hemoglobina en forma d'hemoglobina de Bart. En l'adult, la HbH representa entre el 2-40% de la hemoglobina. Les manifestacions clíniques comprenen anèmia hemolítica amb reticulocitosi, esplenomegàlia, hepatomegàlia.

Estudi bioquímic

L'estudi de les hemoglobines s'efectua aprofitant la seva mobilitat electroforètica:

- Fracció de metahemoglobina: En situacions normals, representa menys del 1,5 % de la hemoglobina en sang. En el cas de la metahemoglobinèmia per deficiència de citocrom-b5-reductasa augmenta un 10-30 %.
- Fracció d'hemoglobina F ($\alpha_2\gamma_2$): En situacions normals representa menys de l'1 % de la hemoglobina en adult. Té una major afinitat per O_2 (el D-2,3-difosfoglicerat s'uneix més a la desoxihemoglobina A que a la desoxihemoglobina F). Augmenta en β^0 -talassèmies i en β^+ -talassèmia homozigòtiques. Es troba inalterada en β^0 -talassèmies i en β^+ -talassèmia heterozigòtiques.
- Fracció d'hemoglobina A_2 ($\alpha_2\delta_2$): En una situació normal representa 2,5-3% de la hemoglobina en adult. Es troba augmentada en β -talassèmia heterozigòtica, β^0 -talassèmia homozigòtica i en β^+ -talassèmia homozigòtica. Es troba disminuïda en α^0 -talassèmia.
- Fracció d'hemoglobina H (β_4): Incapaç de transportar O_2 , és molt afí i no el pot alliberar. Es troba augmentada en α^0 -talassèmia.
- Fracció d'hemoglobina de Bart (δ_4): Incapaç de transportar O_2 , és molt afí i no el pot alliberar. Es troba augmentada en α^0 -talassèmia.

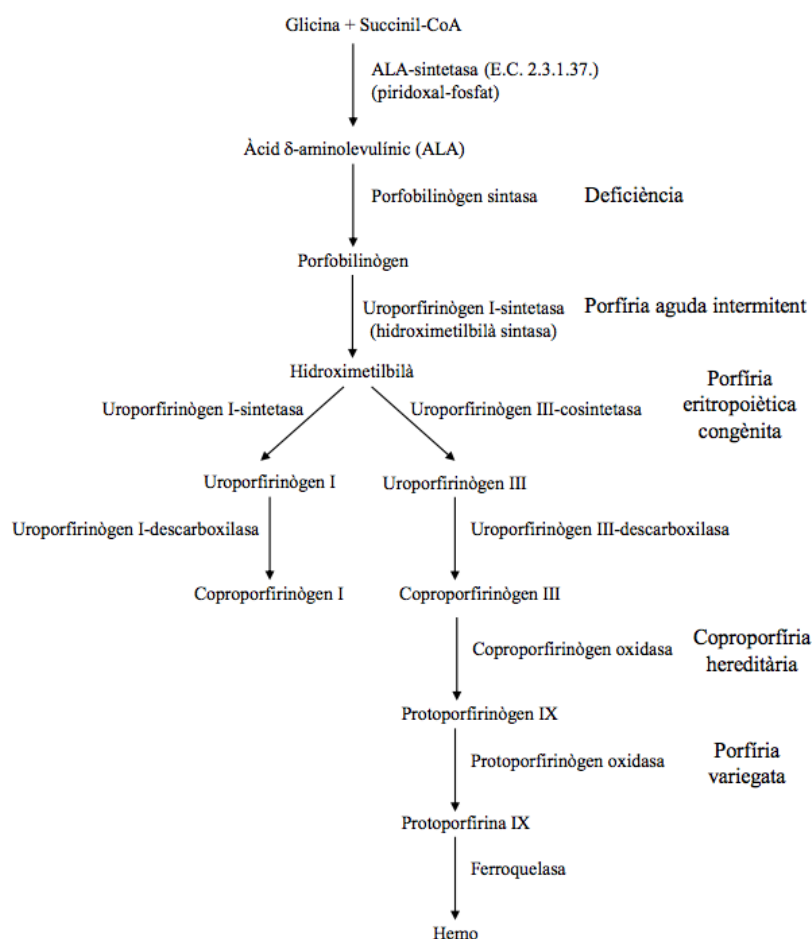
4.4 Desordres de la síntesi del grup hemo

La síntesi del grup hemo té lloc un 85% en eritròcits i un 15% en el fetge.

La biosíntesi del grup hemo parteix de succinil-CoA i glicina. Alteracions en la síntesi del grup hemo produeixen porfíries.

Síntesi del grup hemo

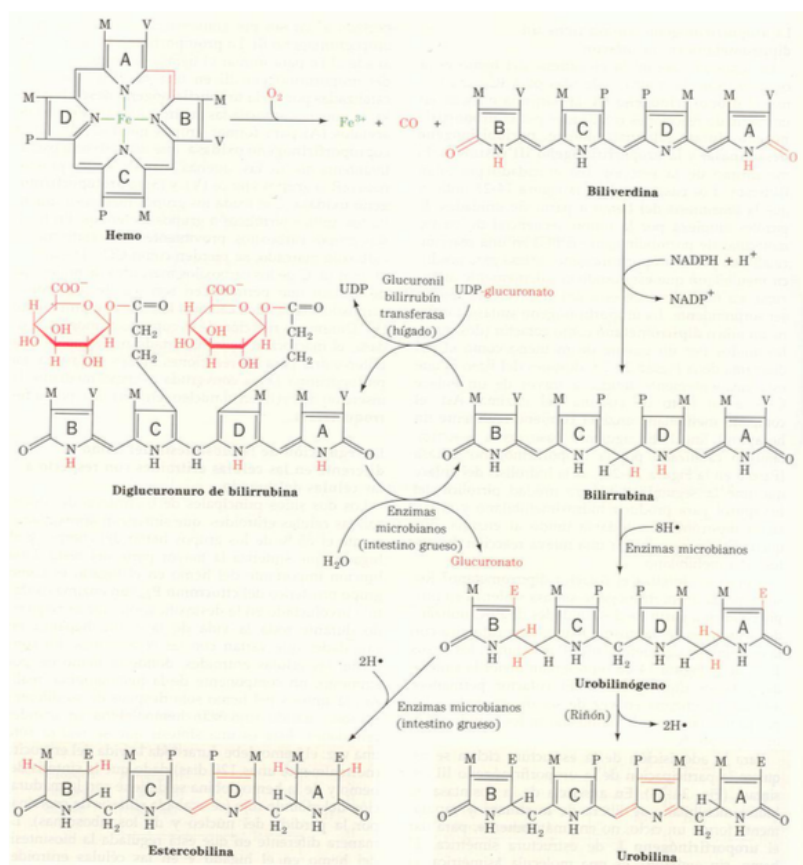
La glicina és un dels precursors principals de les porfirines. La síntesi de porfirines permet la formació dels grups hemo. Un dels intermediaris d'aquesta síntesi és el porfobilinogen que és un cromòfor.



Degradació del grup hemo

Segueix el procés següent:

- 1) Quan el Fe s'elimina del grup hemo, la porció no fèrrica de l'hemo es converteix en biliverdina, un pigment verdós, i després en bilirubina, un pigment groc-ataronjat.
- 2) La bilirubina entra a la sang i es transporta cap al fetge.
- 3) Al fetge, la bilirubina s'allibera per les cèl·lules hepàtiques a la bilis, la qual passa al duodè i després a l'intestí gros.
- 4) A l'intestí gros, els bacteris converteixen la bilirubina en urobilinogen.
- 5) Part de l'urobilinogen es reabsorbeix cap a la sang, es converteix en un pigment groc anomenat urobilina i s'excreta a la orina.
- 6) La major part de l'urobilinogen s'elimina per la femta en forma d'un pigment marró anomenat estercobilina, que li dóna a la matèria fecal el seu color característic.



4.4.1 Porfíries

Els principals enzims implicats en les porfíries són:

- **ALA-sintasa:** Activitat baixa, però influïble per medicaments i esteroides. Presenta retroinhibició pel grup hemo i per l'hemina (hemo-Fe(III)).
- **Uroporfirinògen sintasa:** Control secundari. Quan té una activitat baixa, s'acumula ALA (àcid δ -aminolevulínic) i PBS (porfobilinogen). Una activitat alta provoca una excessiva producció de porfirines lliures.

Hi ha 2 tipus de porfíries:

- 1) Porfíries agudes: Presenten un quadre abdominal, psiquiàtric i autònom.
 - (a) Porfíria aguda intermitent
 - (b) Coproporfíria hereditària
 - (c) Porfíria variegata
- 2) Porfíries no agudes: Associades a fotosensibilitat de la pell.
 - (a) Porfíria hepatocutània
 - (b) Protoporfíria eritropoietica
 - (c) Porfíria congènita

4.4.1.1 Porfíries agudes

N'hi ha 3:

4.4.1.1.1 Porfíria aguda intermitent

És la més freqüent. S'hereta amb caràcter autosòmic dominant. Es tracta d'una deficiència en hidroximetilbilà sintasa (E.C. 4.3.1.89.). Afecta a 3 dones per cada 2 homes.

Els símptomes són dolor abdominal espasmòdic, vòmits, estrenyiment, febre, leucocitosi, hematúria. Hi ha casos d'hipertensió, neuritis perifèrica, alteracions del comportament o psicosi.

Hi ha un augment de l'-ALA sintetasa i una disminució de la uroporfirinogen I sintetasa i la $\delta_4 - 5\alpha$ -reductasa.

L'anàlisi bioquímica es basa en un augment dels nivells d'àcid δ -aminolevulínic i porfobilinogen en orina, una secreció inapropiada d'ADH. Transitòriament, poden augmentar la bilirubina i la fosfatasa alcalina.

4.4.1.1.2 Coproporfíria hereditària

S'hereta amb caràcter autosòmic dominant. És una deficiència en coproporfirinogen-oxidasa (E.C. 1.3.3.3.). Els pacients són asimptomàtics o presenten lleus símptomes neurològics, abdominals o psiquiàtrics. Hi ha casos d'atacs aguts.

Hi ha una excreció constant de coproporfirina III en femta. També hi ha una excreció de forma intermitent de coproporfirina, àcid δ -aminolevulínic i porfobilinogen en orina.

S'atribueix a un bloqueig del pas coproporfirina III \rightarrow protoporfirina, una inducció de ALA-sintetasa o les dues coses a la vegada.

4.4.1.1.3 Porfíria variegata

Hi ha una deficiència en protoporfirinogen-oxidasa (E.C. 1.3.3.4.). Afecta de manera igual a homes i dones. Predomina entre la població blanca d'Àfrica. Apareix entre la tercera i quarta de cada de la vida.

Els símptomes són similars als de la porfíria aguda intermitent, amb lesions cutànies.

Durant els atacs aguts; hi ha un augment d'àcid δ -aminolevulínic, porfobilinogen i porfirines en orina. Les porfirines fecals estan molt elevades i l'ALA-sintetasa també.

4.4.1.2 Porfíries no agudes

En trobem 4:

4.4.1.2.1 Porfíria hepàtica-cutània (hepatocutània)

Els casos familiars són rars. És un grup de porfíries adquirides. Els símptomes són lesions cutànies.

Està associada a malaltia hepàtica (estímul alcohòlic, tractament amb estrògens, ingesta de hexaclorobenzè).

Hi ha una excreció elevada d'uroporfirina en orina. Els valors de PBG i ALA són normals.

4.4.1.2.2 Protoporfíria eritrohepàtica (eritropoiètica)

S'hereta amb caràcter autosòmic dominant. Afecta típicament a eritròcits i a fetge. Els malalts presenten una lleu fotosensibilitat cutània. Apareix els primers anys de la vida o en l'etapa adulta.

Es troba una elevada quantitat de protoporfirina a la circulació. També hi ha nivells fecals elevats de protoporfirina i coproporfirina (fluorescència de la femta). Finalment, hi ha una activitat excessiva de ALA sintasa.

4.4.1.2.3 Protoporfíria eritropoiètica congènita

S'hereta amb caràcter autosòmic recessiu. És poc freqüent i es manifesta just després del part. Aquesta malaltia és la base bioquímica de la llegenda del "home-llop".

La orina presenta un color vermell (excreció de coproporfirina i uroporfirina). Els pacients tenen eritrodòncia (dipòsits vermells fluorescents a les dents), anèmia hemolítica, intensa fotosensibilitat cutània (úlceres i cicatrius), aparició de pèls fins a la cara i extremitats.

També hi ha esplenomegàlia i anèmia hemolítica. Els malalts tenen una mort precoç.

És degut a un defecte enzimàtic de la uroporfininogen III cosintetasa. Hi ha un augment de l'ALA-sintetasa.

4.4.1.2.4 Intoxicació per plom

Els símptomes per intoxicació per plom són dolors abdominals, estrenyiment... es deuen a la inhibició d'algun dels enzims de síntesi del grup hemo.

Hi ha una disminució d'ALA-deshidratasa, ferroquelatasa i oxidasa del coproporfirinogen.

Els anàlisis al laboratori mostren un augment d'ALA i coproporfirines en orina.

Anàlisi de la porfirina

UP = uroporfirina; CP = coproporfirina; PP = protoporfirina; ↑ = augment; ↑↑ = gran augment; N = normal.

Transtorns	Eritròcit			Orina				Femta		
	UP	CP	PP	ALA	PBG	UP	CP	UP	CP	PP
Porfíria aguda intermitent	N	N	N	↑↑	↑↑	↑	↑ / N	N	N	N
Coproporfíria hereditària	N	N	N	↑	↑	N	↑	N	↑	N
Porfíria variegata (atacs aguts)	N	N	N	↑	↑	↑ / N	↑ / N	N	↑	↑↑
Porfíria eritropoiètica congènita	↑↑	↑↑	↑	N	N	↑↑	↑	N	↑	N
Porfíria eritropoiètica	N	N	↑↑	N	N	N	N	N	↑	↑
Porfíria simptomàtica	N	N	N	N	N	↑↑	↑	N	↑ / N	↑ / N
Intoxicació per plom	N	↑ / N	↑	↑	↑ / N	N	↑	N	N	N

FIGURA 6: Observacions bioquímiques típiques associades amb el trastorn de les porfirines

Compost	Intèrval de referència
Eritròcit	
Coproporfirina	0,5 – 2 µg/dl (0,75 – 3 nmol/l)
Protoporfirina	4 – 52 µg/dl (7,2 – 93,6 nmol/l)
Orina	
ALA	1,5 – 7,5 ml / 24 h (11,2 – 57,2 µmol / 24 h)
PBG	< 1 mg / 24 h (< 4,4 µmol / 24 h)
Coproporfirina	50 – 160 µg / 24 h (0,075 – 0,24 µmol / 24 h)
Uroporfirina	10 – 30 µg / 24 h (0,012 – 0,037 µmol / 24 h)
Femta	
Coproporfirina	0 – 500 µg / 24 h (0 – 0,75 µmol / 24 h)
Protoporfirina	0 – 600 µg / 24 h (0 – 1,08 µmol / 24 h)

FIGURA 7: Valors de referència de les porfirines i els seus precursors

Totes les porfirines tenen un espectre UV pròxim al visible. Es veu una intensa banda a 400 nm (Banda de Soret) que emet fluorescència vermella. Es poden quantificar valors de $2 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/L}$. La solubilitat disminueix en reduir grups hidroxil i carboxils:

- PBS i uroporfirina: s'excreten en orina
- Protoporfirina: via bilis, s'excreta en femta
- Coproporfirina s'excreta en orina com a coproporfinogen

La determinació d'**ALA i PBG** es fa pel mètode de Watson (1941). El PBG es condensa amb p-dimetil-aminobenzaldehyd en àcid clorhídric (reactiu d'Ehrlich) i forma un complex magenta.

Les **porfirines** es determinen amb una extracció amb dissolvent orgànic (àcid acètic, acetat d'etil), una extracció d'HCl o bé per determinació espectrofotomètrica o fluorimètrica.

La determinació d'**ALA-deshidratasa** és molt útil en intoxicacions per plom (a més de plumbèmia, coproporfirines i ALA). El mètode de Bonsignore mesura el PBG produït (el PBG es transforma a porfirina durant l'assaig). El mètode de Tomokumi mesura l'ALA consumida.

4.5 Alteracions del metabolisme del ferro

L'anèmia és una condició patològica en què la concentració d'hemoglobina és molt baixa, i hi ha una pèrdua de la capacitat del transport d'oxigen.

Compost	Intèrval de referència
Eritròcit	
Coproporfirina	0,5 – 2 µg/dl (0,75 – 3 nmol/l)
Protoporfirina	4 – 52 µg/dl (7,2 – 93,6 nmol/l)
Orina	
ALA	1,5 – 7,5 ml / 24 h (11,2 – 57,2 µmol / 24 h)
PBG	< 1 mg / 24 h (< 4,4 µmol / 24 h)
Coproporfirina	50 – 160 µg / 24 h (0,075 – 0,24 µmol / 24 h)
Uroporfirina	10 – 30 µg / 24 h (0,012 – 0,037 µmol / 24 h)
Femta	
Coproporfirina	0 – 500 µg / 24 h (0 – 0,75 µmol / 24 h)
Protoporfirina	0 – 600 µg / 24 h (0 – 1,08 µmol / 24 h)

FIGURA 8: Valors de referència de la concentració d'hemoglobina

Els eritròcits són discs bicòncaus de 2 µm d'amplada i 7 µm de diàmetre. Un 66% és aigua i un 33% és Hb. Tenen una vida mitjana de 120 dies. Moren fagocitats a la melsa, fetge i medul·la òssia.

La funció principal és donar suport a la hemoglobina per transportar O₂ i CO₂. Es transporta el 20% del CO₂ produït als teixits contribueixen en la capacitat tamponadora de la sang.

La eritropoesi és el procés de producció d'eritròcits. Regulat per la hormona eritropoetina (regulada per la quantitat de O₂ que arriba als teixits).

Hi ha 2 tipus d'anèmies:

- Anèmies arregeneratives per fallida a la eritropoesis:
 - Fallida qualitativa: lesió de la cèl·lula mare pluripotent
 - * Aplàsia medular
 - * Aplàsia medicamentosa
 - * Fibrosis medular
 - * Anèmia mieloptísica per invasió medular (neoplàsies, mielomes, etc.)
 - * Mecanisme autoimmune
 - Fallida quantitativa: alteració de la maduració eritroblàstica
 - * Carencials (per dèficit de cianocobalamina, folats o ferro).

-
- * Diseritropoiètiques (bloqueig del ferro, talassèmies i bloqueig de la síntesi del grup hemo)
 - * Mixtes, per neoplàsies, cirrosis, infeccions o lesions renals
 - Anèmies regeneratives:
 - Per pèrdua d'eritròcits: hemorràgiques
 - Per augment de la destrucció dels eritròcits: hemolítiques
 - * Anèmies hemolítiques congènites:
 - Anomalies de la membrana (esferocitosis, eliptocitosis, xerocitosis, etc.)
 - Alteracions enzimàtiques (dèficit de glucosa-6-P deshidrogenasa, dèficit de piruvat kinasa, etc.)
 - Hemoglobinopaties (talassèmies i hemoglobinopaties estructurals)
 - * Anèmies hemolítiques adquirides:
 - Autoimmunes i postransfusionals
 - Causes mecàniques (anèmia microangiopàtica)
 - Causes infeccioses o químiques
 - Causes desconegudes (hemoglobinúria paroxística nocturna)
 - Per recuperació d'una anèmia carencial tractada

4.5.1 Anèmies megaloblàstiques

Són degudes al dèficit de cianocobalamina o folat; que intervenen en la síntesi de DNA, que estarà disminuïda. Hi ha una alteració de l'eritropoesi (asincronia madurativa entre nucli i citoplasma de cèl·lules precursors de l'eritròcit). L'eritropoesi és ineficaç.

Les causes principals d'anèmies megaloblàstiques són:

- Deficiència de cobalamina
 - Dèficit en l'alimentació (vegetarians estrictes)
 - Dèficit de secreció del factor intrínsec (Anèmia perniciosa):
 - * Per la destrucció de mucosa gàstrica o post-gastrectomia
 - * Per l'existència d'un factor intrínsec biològicament inactiu
 - * Per l'existència d'anticossos contra el factor intrínsec
 - Alteració del budell prim: Malabsorció o parasitació per *Dibothriocephalus latius*.
 - Deficiència de transcobalamina
 - Augment de les necessitats de cianocobalamines: Embaràs o augment de la proliferació cel·lular.
- Deficiència de folat

-
- Dèficit en la dieta
 - Malabsorció
 - Interferències farmacològiques en la seva metabolització.
 - Augment de les necessitats: Embaràs o augment de la proliferació cel·lular.

4.5.1.1 Anàlisi bioquímic

Augmenta el Fe oxidat ja que no es pot utilitzar de forma adequada pel transport d'oxigen. Pot augmentar el folat i la B12 en plasma si s'ingereix però hi ha una malabsorció. També s'analitza el nombre d'eritròcits en sang.

En les anèmies mieloblàstiques degudes al dèficit en cobalamina; hi ha una disminució de la cobalamina en plasma i un augment del metilmalonat en orina ja que no es pot oxidar a succinat per manca de cobalamina.

4.5.1.2 Prova de Schilling

Estudia la causa de la disminució de cobalamina per diferenciar entre anèmia perniciosa i malabsorció. Es basa en l'administració al pacient de 2 càpsules per via oral:

1. ^{57}Co -cianocobalamina + factor intrínsec
2. ^{58}Co -cianocobalamina sense factor intrínsec

Després s'administra cianocobalamina per via intramuscular. Aquesta injecció satura el transportador sanguini (transcobalamina II) i obliga la secreció via orina de la cobalamina ingerida. Després es mesura la radioactivitat en orina 24 h després de la injecció.

Els resultats poden ser:

-

4.5.2 Anèmies hemolítiques

4.5.3 Anèmia ferropènica

4.5.4 Anèmia sideroblàstica

4.5.5 Hemocromatosis

4.6 Casos clínics

1)

5. Enzimologia clínica

5.1 Enzims

L'enzimologia clínica és un conjunt de tècniques destinades a detectar la presència i a quantificar l'activitat d'enzims en mostres biològiques:

- Presència d'enzims que no es trobin normalment en concentracions significatives
- Variacions en els nivells d'enzims que poden trobar-se normalment en mostres biològiques
- Isoenzims (formes diferents d'un enzim)

Es poden utilitzar enzims com a reactius específics per quantificar la concentració de metabòlits.

Un enzim és un biocatalitzador proteic. Es localitzen en tots els teixits corporals. Es determinen mitjançant la reacció enzimàtica. Un holoenzim està format per un apoenzim (porció proteica) i coenzim (porció no proteica no sempre necessària). L'activitat enzimàtica es pot veure reduïda si no hi ha apoenzim o coenzim.

Els enzims tenen destrucció citoplasmàtica o mitocondrial. A la circulació es poden eliminar per catabolisme que alliberarà aminoàcids i grups prostètics per la síntesi de noves proteïnes i/o enzims.

Tots els enzims sèrics tenen un origen cel·lular. Apareixen al sèrum com a conseqüència d'una lesió cel·lular (en petites quantitats de la degradació cel·lular). Les activitats enzimàtiques del sèrum són útils pel diagnòstic de malalties particulars o anomalies fisiològiques.

Quan les cèl·lules estan en proliferació, augmenta la síntesi d'enzims i s'atura el seu catabolisme. En l'estat d'inactivació, hi ha un descens de la síntesi d'enzims i augmenta la seva degradació degut a la carència de cofactors.

Els enzims difonen a la limfa, passen a la sang on s'inactiven (pèrdua de grups prostètics, canvis conformationals) i es catabolitzen. Els enzims es destrueixen en fagòcits, melsa, endotelials, cèl·lules sanguínies.

L'ús de certs enzims per diagnosticar malalties és per circumstàncies històriques. No és normal que un enzim que funciona sigui substituït per un altre, a no ser que la utilitat diagnòstica sigui molt millor.

5.1.1 Lesió cel·lular

Hi ha enzims i metabòlits intracel·lulars i extracel·lulars en una situació normal. Si hi ha una lesió cel·lular, es detecten enzims i metabòlits intracel·lulars a la sang.

Els enzims intracel·lulars poden aparèixer al plasma degut als processos normals de recanvi cel·lular. L'increment dels enzims pot ser degut a la lesió cel·lular o a l'augment de la proliferació.

5.1.2 Mesura de la concentració dels enzims

- **Concentració de massa:** Quantitat de l'enzim.
- **Concentració catalítica:** Activitat de l'enzim. És el més usat. Es pot expressar com a:
 - Activitat enzimàtica: Quantitat d'enzim que transforma un micromol de substrat per minut a 25°C. Es poden fer servir UI o katal.
 - Activitat específica: Unitats de l'enzim per mil·ligram de proteïna
 - Activitat molecular o molar: Número de molècules de substrat transformades per minut per una sola molècula d'enzim
- **Concentració d'isoformes:** Permet discriminar el teixit d'origen.

L'activitat enzimàtica pot variar degut a la temperatura, pH, concentració de substrat, força iònica... La prova s'ha d'adequar a les concentracions òptimes de l'enzim.

5.1.3 Distribució cel·lular dels enzims

TAULA 2: Localització subcel·lular d'enzims amb importància clínica

La presència d'enzims mitocondrials en sèrum és indicatiu de dany greu.

La detecció d'una isoforma permet fer un diagnòstic més precís. Es poden detectar per:

- Diferència de càrrega neta (cromatografia, electroforesi, isoelectroenfocament)
- Acció selectiva de determinades substàncies (inhibició selectiva)
- Tècniques immunològiques (immunoinhibició, enzimimmunoassaig)

Poden alliberar-se els enzims encara que no hi hagi necrosi hística (augment de la permeabilitat de les membranes) als teixits. Exemple: delirium tremens.

La fosfatasa alcalina és un marcador per malalties hepatobiliars. En canvi, hi ha altres enzims més bons com la leucinaminopeptidasa o la 5'-nucleotidasa.

Un altre exemple és la GPT (hepatopatia) que no ha estat substituïda per la ornitin-carbamoïl-transferasa o iditol-deshidrogenasa.

5.1.4 Interès diagnòstic dels enzims

Les anàlisis enzimàtiques representen fins un 20% de les proves bioquímiques. Els laboratoris de bioquímica clínica poden determinar entre 12-15 enzims diferents.

Actualment s'han determinat més de 60 enzims en sèrum, dels quals:

- Alguns es determinen habitualment al laboratori
- Alguns són reflex de diverses malalties, però no es determinen degut a la seva dificultat
- Alguns són importants a nivell de recerca, i només es determinen en situacions clíniques especials

5.2 Estratègies bioquímiques per l'estudi clínic del metabolisme

Els enzims es poden estudiar de diferents maneres:

1. Determinació de la concentració de metabòlits en líquids i teixits biològics
2. Determinació d'activitats enzimàtiques en líquids i teixits biològics
3. Diferenciació de les formes isoenzimàtiques
4. Anàlisi de la resposta metabòlica en front proves diagnòstiques específiques

5.2.1 Cinètica de les reaccions enzimàtiques monosubstrat

Si:

- L'espectrofotòmetre absorbeix el substrat, l'absorbància disminuirà en funció del temps.
- L'espectrofotòmetre absorbeix el producte, l'absorbància augmentarà en funció del temps.

S'ha d'escollir la longitud d'ona on es distingeixi l'absorció del substracte de la del producte.

5.2.2 Procediments per a mesurar la velocitat de transformació??

Hi ha 2 tipus:

1. Procediments discontinus:

- (a) A un punt.- Es mesura l'absorbància de la mostra i de un blanc al cap d'un temps determinat.

$$v = \frac{A_t - A_{Blanc}}{t} \quad (6)$$

- (b) A dos punts.- Es mesuren 2 absorbàncies (A_1 , A_2) a dos temps (t_1 , t_2).

$$v = \frac{A_2 - A_1}{t_2 - t_1} \quad (7)$$

-
- (c) A tres o més punts.- Es mesura l'absorbaïncia a diversos valors de temps (mesurar dos punts pot ser inexacte).

$$v = \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (8)$$

2. **Procediments continus:** Es mesura l'absorbaïncia continuament durant un temps determinat.

$$v = \frac{dA}{dt} \quad (9)$$

5.2.3 Aplicació de tècniques enzimàtiques combinades

La concentració dels enzims és molt baixa (nmol) i per tant es mesura la seva activitat (o bé s'aplica immunoanàlisi).

Hi ha 3 fases de l'activitat enzimàtica:

1. Període de latència. La velocitat va augmentant progressivament.
2. Estat estacionari. La velocitat és proporcional a la concentració de l'enzim.
3. Fase final.- la velocitat disminueix progressivament és on es fa l'anàlisi)

La malaltia deshidrogenasa té concentracions molt baixes, per tant s'aplica a reaccions acoblades. Es mira l'activitat de l'enzim anterior o posterior.

5.2.4 Procediment general d'anàlisi per espectrofotometria visible o UV

L'espectroscòpia estudia els sistemes mitjançant la seva interacció amb les radiacions electromagnètiques. Un sistema és un conjunt de partícules materials (àtoms, molècules).

- Absorció
- Emissió
- Difracció

L'espectrometria d'absorció molecular UV-visible és molt utilitzada en clínica. Estudia l'absorció de la radiació magnètica ultravioleta i visible. Permet mesurar la concentració d'una substància.

L'espectre electromagnètic és el conjunt de totes les longituds d'ona.

En un laboratori clínic s'utilitza amb més freqüència les regions visible i ultraviolada. Els espectrofotòmetres poden ser de:

- Feix simple: Primer es posa el blanc com a referència i després la mostra.
- Feix doble: Detecta el blanc i la mostra alhora.

5.3 Enzims marcadors habituals en enzimologia clínica