
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	Control de qualitat	8
	Normativa aplicable — 8 • Control de qualitat — 8	
4	Proteïnes plasmàtiques	10
	Proteïnes plasmàtiques de transport — 10 • Proteïnes de fase aguda — 11 • Altres proteïnes — 12 • Determinació de la proteïna total — 13 • Interpretació clínica — 15 • Fraccionament de proteïnes — 15 • Mètodes immunològics per la detecció de proteïnes — 17	
5	Hemostàsia i coagulació	18
	Introducció — 18 • Hemostàsia primària — 19 • Hemostàsia secundària/Coagulació proteica — 24 • Fibrinòlisi — 28	
6	Hemoglobina i ferro	33
	La hemoglobina — 33 • Trastorns deguts a reaccions de l'hemoglobina — 34 • Trastorns a la síntesi de la globina — 35 • Desordres de la síntesi del grup hemo — 38 • Alteracions del metabolisme del ferro — 44 • Metabolisme del ferro — 50	
7	Enzimologia clínica	54
	Enzims — 54 • Estratègies bioquímiques per l'estudi clínic del metabolisme — 56 • Enzims marcadors habituals en enzimologia clínica — 59	
8	Disfuncions del metabolisme glucídic	68
	Regulació de la concentració de la glucosa sanguínia — 68 • Hiperglucèmies — 69 • Paràmetres clínics — 72 • Hipoglucèmies — 76 • Intoleràncies — 77	
9	Disfuncions del metabolisme lipídic	78
	Conceptes generals — 78 • Paràmetres analítics — 82 • Dislipèmies — 86	
10	El fetge	91
	El fetge — 91 • Estudi de la funció excretora — 91 • Estudi de la capacitat detoxificant — 95 • Estudi de les capacitats biosintètica i metabòlica — 95 • Marcadors sèrics — 96 • Alteracions hepàtiques — 98	

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, ingestió 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 orginal.

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 ereta 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 CO₂ 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 (deut a microtrenament de fibres muscualars).

- **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'estrés i les alteracions dels ritmes circadianos:

- 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 sudoracuó 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 CO₂ i H₂O i OH. La malnutrició i el dejuni causen la disminució de proteïnes plasmàtiques.
 - La obesitat augmenta el colesterol.
 - La ingestió 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 (debat 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 dóna 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 produceix 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 quotient 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.

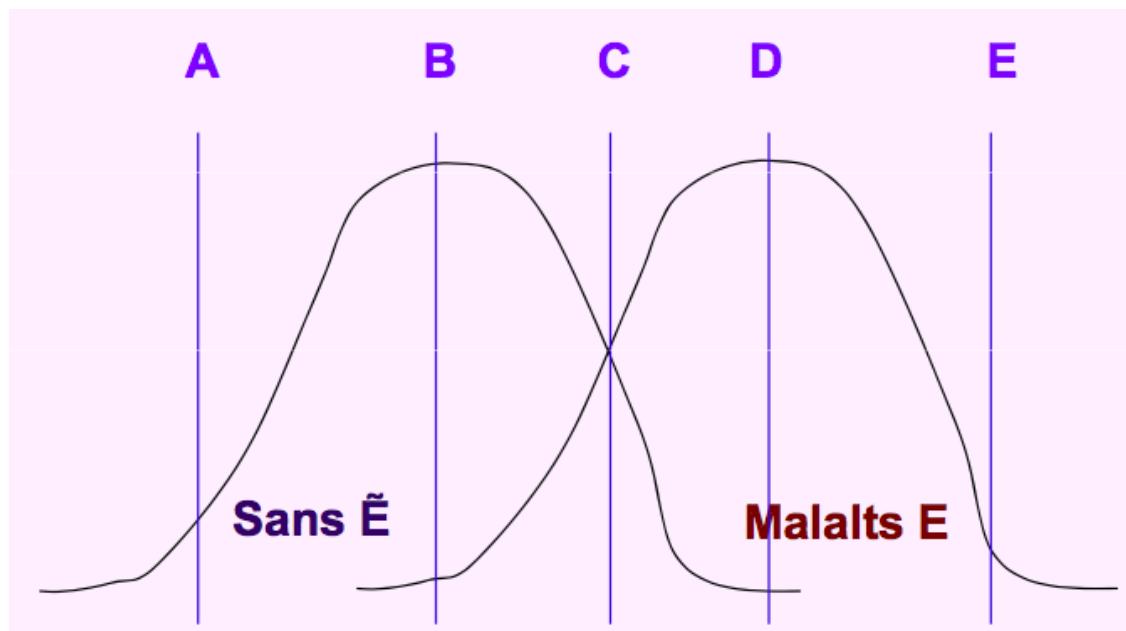
- Positiu: Probabilitat de patir-la si el diagnòstic és positiu:

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

- 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. Control de qualitat

3.1 Normativa aplicable

El decret 76/1995, de 7 de març??, pel qual s'estableixen el procediment específic d'autorització administrativa dels laboratoris clínics i les normes reguladores de les activitats que s'hi realitzen.

És d'obligat compliment per tots els laboratoris clínics que treballen a Catalunya. Estableix les normatives i requisits que aquests han de complir, així com els tràmits a realitzar per a l'inici, la modificació i la baixa de l'activitat:

1. Requisits de personal i d'organització: tècnic facultatiu responsable i personal amb titulació adient.
2. Requisits físics: àrees diferenciades (àrea administrativa, àrea d'obtenció d'espècimens, àrea de realització d'anàlisis i àrea de neteja de material i d'eliminació de residus).
3. Requisits d'equipament: aparells i l'instrumental necessaris per als tipus d'anàlisis que realitzin.
4. Requisits de protecció i seguretat: sistemes de protecció i seguretat que els siguin d'aplicació d'acord amb la normativa vigent.

3.2 Control de qualitat

Segons el Decret 76/1995, el laboratori clínic ha d'establir el seu pla de garantia de la qualitat, que haurà d'incloure ineludiblement el control intern de la qualitat i la participació, almenys, en un programa d'avaluació externa de la qualitat. El laboratori ha de participar en el Programa de control de qualitat dels laboratoris clínics (PCQLC) del Departament de Sanitat i Seguretat Social.

Els objectius del control de qualitat és la detecció d'errors en la valoració de la magnitud d'origen analític o per manipulació de la mostra:

- Exactitud: Valor veritable (\bar{X}). Control de Qualitat Interna.
- Precisió: SD o CV. Control de Qualitat Externa.
- Relació de coeficients de variació. Control de Qualitat Externa.
- Índex de desviació estàndard. Control de Qualitat Externa.

3.2.1 Control de qualitat intern

Les estratègies són la valoració per duplicat de les mostres clíniques o la intercalació de materials de control en rangs de referència i patològics.

El procediment es basa en intercalar els controls en les sèries de mostres de manera aleatòria o amb l'ús de la condició de cecs (sense identificació) o semicecs (identificats amb valor desconegut).

Per valorar la qualitat interna s'usa el límit de variabilitat de control ($\bar{X} \pm SD$) i les regles de Westgard.

3.2.2 Control de qualitat extern

Busca comparar els resultats de controls en diferents laboratoris.

El procediment pot ser:

- **De garantia de qualitat diaris:** Comparen resultats sobre una mostra obtinguts amb un sol mètode i calculen la imprecisió i la inexactitud.
- **D'acreditació:** Comparen resultats sobre una mostra obtinguts amb un sol mètode i calculen la imprecisió i la inexactitud. S'atorga una certificació oficial.

Per valorar la qualitat interna s'usa el límit de variabilitat de control ($\bar{X} \pm SD$) i l'error total.

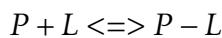
4. Proteïnes plasmàtiques

Hi ha 4 grans grups de proteïnes plasmàtiques:

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

4.1 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 albúmina 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'albúmina té un pI molt baix i corre molt, la prealbúmina 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 **prealbúmina** 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.

La **albúmina** 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 síntoma de deshidratació. La hipoalbuminèmia pot ser síntoma 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'albúmina 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.

4.2 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'albúmina, RBP, transferrina) i positives (augmenten quan hi ha infecció).

Hi ha 2 proteïnes de fase aguda positives importants:

- **Proteïna C reactiva:** Té una mobilitat electroforètic 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'estrés respiratori del nouvat. 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 30-65	0.0008-0.008 64-76	0.4 69-74	6-10 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)

4.3 Altres proteïnes

4.3.1 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 respistes 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...

4.3.2 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
- Lupus
- Artritis reumatoide
- Glomerulonefritis
- Septicèmia

Altres proteïnes plasmàtiques són:

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

4.4 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 dóna 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 $factor \cdot A260$.
- 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 μ g–1mg	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 μ g	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 μ g	Reactive with amines, phenols, thiols and imidazoles. Sensitive but slow and complex procedure. Some detergents can interfere (84).
Fluorescamine	0.1–50 μ g	Fluorescent on reaction with primary amines under alkaline conditions. Relatively free of interference, simple procedures, rapid results (Roche).
(Micro) Lowry	1–50 μ g	Some variability with proteins, interfering detergents can be solubilized by SDS (79).
Manual ninhydrin	1–50 μ g	No protein variability since proteins are degraded to amino acids. High levels of detergents can interfere. Time consuming (77).
BCA (Pierce)	0.5–50 μ g	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.

4.5 Interpretació clínica

[Prot. total] (g/L)

Edat	Dones	Homes
18-30	66-77	70-78
30-65	64-76	69-74

[Albúmina] (g/L)

Edat	Dones	Homes
18-30	42-50	46-50
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

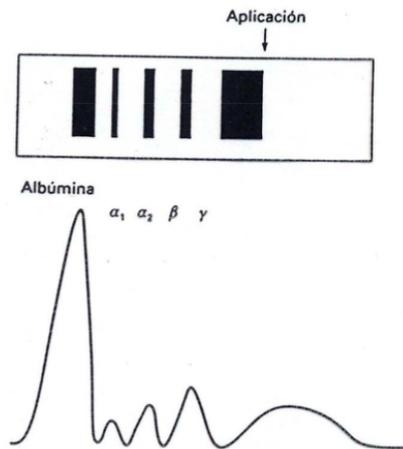
Les causes d'una **disminució** de la proteïna total:

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

4.6 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'albúmina i les globulines α , β i γ .

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

Fracció	%	[] g/dL
Albúmina	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

4.6.1 Patrons electroforètics anòmals

- **Hiperproteïnèmia:** pèrdua d'intensitat de bandes (més acusat per l'albúmina)
- **Síndrome nefròtic:** es perden les proteïnes de baix pes molecular i es conserven les d'alt pes molecular
 - Disminueixen l'albúmina i les γ -globulines.
 - Augmenten les α_2 -globulines
- **Proteinúria tubular:** Degut a trastorns renals tubulars que comporten pèrdua de proteïnes. Disminueixen α , β i γ -globulines.
- **Cirrosi:** Augmenta γ -globulines i disminueix l'albúmina (dany hepàtic)

-
- **Reactants de fase aguda:** Augmenten les α_1 (antitripsina i glicoproteïna àcida) i les α_2 (haptoglobina).
 - **Dèficit de Fe:** Augmenta les b_1 (transferrina).
 - **Hipergammaglobulinèmies:** Augmenten les bandes específiques en regió γ corresponent als Abs monoclonals. Es dóna en processos inflamatoris, virals, ...
 - **Paraproteinèmies:** Apareixen bandes molt definides com en el mieloma múltiple o la macroglobulinèmia de Waldenström.

4.7 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
- Immunoelectroforesi
- Immunoturbidimetria: sèrum + Ac específic a 420 nm
- Nefelometria: sèrum + Ab específic (lectura de llum refractada 90°)
- Immunoassaig radioactius o enzimàtics (RIA, ELISA)

5. Hemostàsia i coagulació

5.1 Introducció

5.1.1 Hemostàsia

L'hemostàsia és l'equilibri entre factors anticoagulants i procoagulants. Els mecanismes de control són:

1. Vasoconstricció
2. Hemostàsia primària o formació del trombe plaquetari (blanc)
3. Hemostàsia secundària o coagulació (formació del coàgul de fibrina)
4. Fibrinòlisi o trencament del coàgul de fibrina

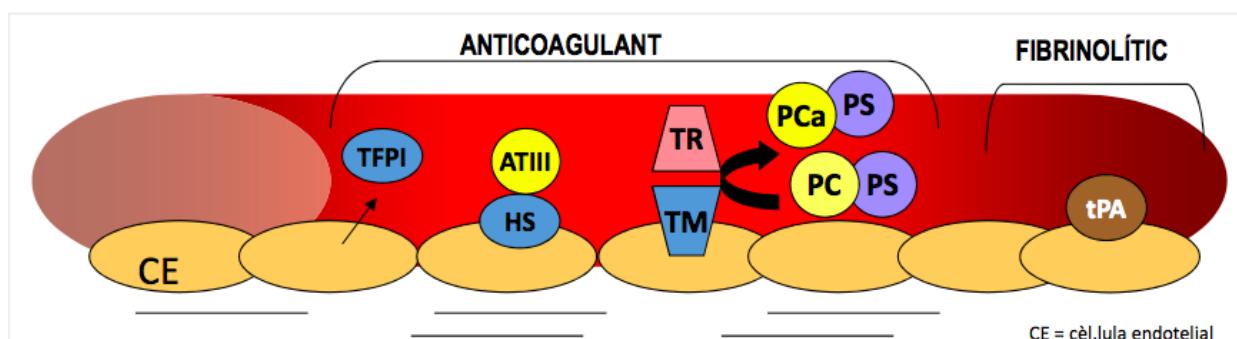
Les característiques d'aquesta resposta són:

- Resposta ràpida i temporal
- No ha d'ocluir la llum del vas lesionat
- Localitzada al lloc de la ferida
- Resistent al flux sanguini per tal d'evitar tromboembolismes

5.1.2 Paper de la cèl·lula endotelial

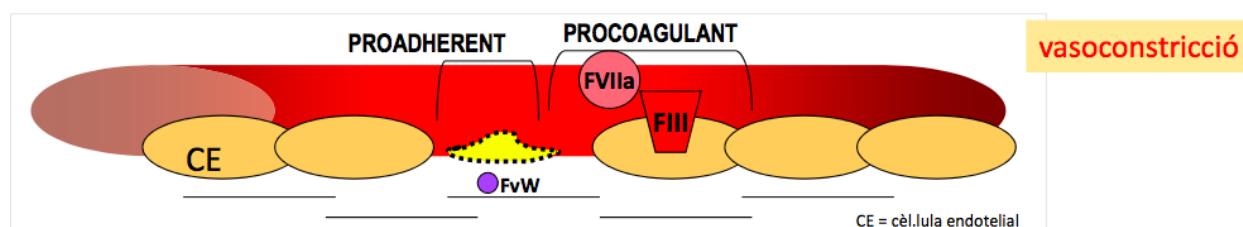
Les cèl·lules endotelials no pertorbades tenen efectes anticoagulants i fibrinolítics:

- Anticoagulants: per la producció de:
 - *Tissue factor pathway inhibitor* que forma part de la via extrínseca.
 - Heparansulfats que activen l'antitrombina III.
 - Trombomodulina: la qual unida a la trombina activa les proteïnes inhibidores de la coagulació, la proteïna C i la proteïna S.
- Fibrinolítics: degut a la protecció de *tissue plasminogen activator* (tPA).



Quan es pertorben les cèl·lules endotelials es produeixen efectes proadherents de plaquetes i procoagulants. Quan es trenca la paret d'un vas, s'exposa el subendoteli el qual expressa el factor de von Willebrand.

- Proadherents de plaquetes: per exposició del factor de von Willebrand (FvW) subendotelial.
- Procoagulants: per contacte del factor VIIa de coagulació circulant amb el factor III de coagulació tissular, el qual és produït per cèl·lules endotelials estimulades per endotoxines o citocines i per cèl·lules subendotelials del múscul llis constitutivamente.



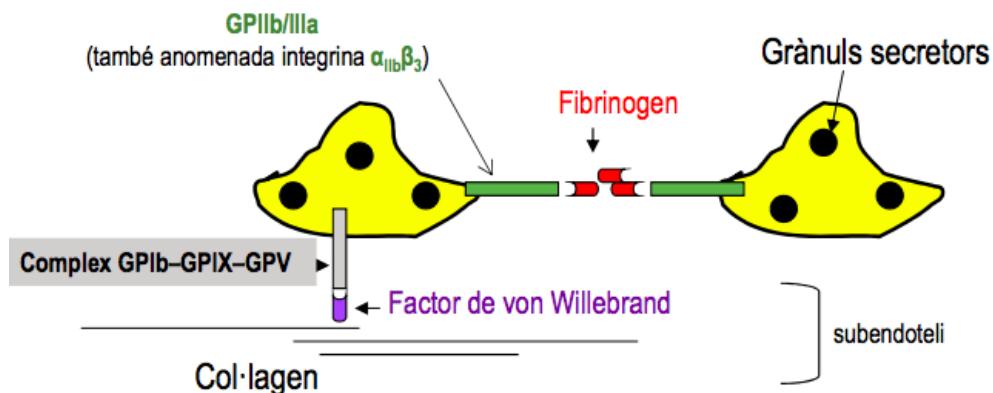
5.2 Hemostàsia primària

Quan l'endoteli es danya, s'exposa el teixit connectiu subjacent i s'hi adhereixen les plaquetes i es forma un trombe blanc. En paral·lel s'activa la hemostàsia secundària. S'alliberen factors de coagulació de plaquetes, cèl·lules danyades i del plasma (calci, vitamina K).

Les plaquetes són fragments citoplasmàtics dels megacariòcits, anucleats i rics en vesícules secretores, els quals es formen a la medul·la òssia i passen a circulació. Presenten glicoproteïnes (GP) inserides en la membrana que els permeten establir contactes entre elles i amb el subendoteli. A mesura que les plaquetes envelleixen, es fan més petites.

Típicament, les plaquetes tenen una forma arrodonida. Quan les plaquetes s'activen, adquireixen una forma estrellada.

Per tal que la plaqua s'uneixi al factor de von Willebrand, expressa glicoproteïnes tipus integrina i altres. El complex GPIb-GPIX-GPV s'expressa en plaquetes i uneix FvW. Un cop les plaquetes s'uneixen al FvW, les integrines plaquetàries GPIIb/IIIa s'uneixen al fibrinogen circulant. El fibrinogen pot fer de pont entre 2 integrines que estan en plaquetes diferents.



Els factors més importants que alliberen les plaquetes són ADP, serotoninina, TXA2. El ADP, tromboxà, vWF reforcen la senyalització que activa a les plaquetes circundants i fa que es tornin més adherents permetent la agregació plaquetària. El tromboxà, la serotoninina activen la vasoconstricció local que produceix i manté la contracció de la musculatura llisa vascular amb el que es disminueix el flux sanguini pel vas lesionat.

Els inhibidors de la funció plaquetària:

- **Aspirina:** l'àcid acetilsalicílic inhibeix la producció de TXA2 a partir d'àcid araquidònic en inactivar irreversiblement l'enzim ciclooxygenasa (COX). Després que el tractament amb aspirina s'atura, l'activitat de l'enzim retorna a mida que noves plaquetes s'incorporen a la circulació (la taxa diària de regeneració és d'aproximadament un 10%). Inhibeix l'agregació plaquetària.
- Els **àcids grassos omega 3** de la dieta o suplements dietètics: competeixen amb l'àcid araquidònic com a substrats per la COX i produueixen TXA3 que és biològicament inert.

La trombina també contribueix a l'activació de les plaquetes.

5.2.1 Patologies relacionades amb l'hemostàsie primària

Poden ser:

- **Origen vascular:** La paret vascular pot estar afectada per falta de resistència o impermeabilitat o manca de constricció. La vitamina C és crucial pel bon manteniment. Un síntoma és el sagnat de les genives.
- **Origen plaquetari:**
 - En el nombre:
 - * Baixa producció
 - * Distribució patològica: acumulació a la melsa causant esplenomegàlia
 - * Destrucció per malalties autoimmunes
 - En la funcionalitat

- * Adquirides: intoxicació per aspirina
- * Hereditàries:
 - Deficiència al factor de von Willebrand
 - Deficiència en glicoproteïnes de membrana plaquetària:
 - Gens de GPI α , GPIX, GPI β : Síndrome de Bernanrd Soulier (vWF)
 - Gens del sistema IIb-IIIa: Síndrome de Glanzmann (fibrinogen)
 - Deficiència en la formació de grànuls: Síndrome gris de la plaqueta i altres.

5.2.1.1 Malalties hereditàries de deficiència plaquetària

Poden ser degudes a:

- Deficiència del factor de Von Willebrand (Malaltia de Von Willebrand)
- Anormalitats de les plaquetes
 - Anormalitats dels receptors de proteïnes adhesives
 - * GPIb-IX-V complex (síndrome de Bernard-Soulier (SBS)*, platelet-type von Willebrand disease*)
 - * GPIIb-IIIa (α IIb β 3; malaltia de Glanzmann)
 - * GPIa-IIa (α 2 β 1)
 - * GPVI
 - * GPIV
 - Anormalitats dels receptors d'agonistes solubles
 - * Receptor del Tromboxà A2
 - * Receptor P2Y12 (ADP)
 - * Receptor α 2-adrenèrgic
 - Anormalitats dels grànuls plaquetaris
 - * δ -grànuls (d-storage pool deficiency, Hermansky-Pudlak syndrome, Chediak-Higashi syndrome, thrombocytopenia with absent radii syndrome*)
 - * α -grànuls (Gray platelet syndrome*, ARC syndrome*, Quebec platelet disorder*, Paris-Trousseau-Jacobsen syndrome*)
 - * α - i δ -grànuls (α , δ -storage pool deficiency)
 - Anormalitats de les vies de transducció de senyal
 - * Defectes primaris de secreció
 - * Anormalitats de la via de l'àcid araquidònic/tromboxà A2

-
- * Deficiència en $G\alpha q$
 - * Deficiència parcial selectiva de PLC- $\beta 2$
 - * Defectes en la fosforilació de pleckstrin
 - * Defectes en la mobilització de Ca^{2+}
 - Anormalitats del citoesquelet
 - * Desordres relacionats amb MYH9 (May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, Epstein syndrome)*
 - * Wiskott-Aldrich syndrome*
 - * X-linked thrombocytopenia*
 - Anormalitats dels fosfolípids de membrana
 - * Scott syndrome

* Aquests desordres es presenten normalment amb trombocitopènia a més dels la disfuncionalitat.

5.2.1.2 Trombocitosi

Hi ha un elevat nombre de plaquetes, que pot ser per causes:

- **Primàries:** Per trastorns mieloproliferatius. Les cèl·lules dins de la medul·la òssia produueixen més plaquetes: trombocitèmia essencial o altres policitèmies (en les que també incrementen altres cèl·lules sanguínies).
- **Secundàries:** deguda a:
 - Infeccions
 - Malalties inflamatòries
 - Pèrdua de sang (la medul·la òssia respon incrementant la producció cel·lular)
 - Dany tissular per trauma o cirurgia
 - Alguns fàrmacs
 - Melsa inactiva o esplenectomia

5.2.2 Tests per avaluar la hemostàsia primària

5.2.2.1 Fragilitat capil·lar

Es fa servir el mànec de l'aparell per mesurar la pressió arterial o esfigmomanòmetre i es col·loca al voltant de la part superior del braç. S'infla fins a una pressió més o menys entre la sistòlica i la diastòlica de la persona (potser 100 mm Hg) i es deixa posat durant 4 a 6 minuts.

En una prova positiva, apareixen nombrosos punts vermells petits (petèquies) a la pell per sota del mànec. Aquestes petèquies són conseqüència de la fragilitat capil·lar.

En una àrea de 5 cm^2

- 0 a 10 = 1+
- 10 a 20 = 2+
- 20 a 50 = 3+
- 50 o més petèquies = 4+

L'examen de fragilitat capil·lar no és específic per l'escorbut.

5.2.2.2 Temps de sagnia

Es practica un tall de dimensions estandarditzades en el teixit subcutani (afecta a capil·lars) i es mesura el temps que tarda en bloquejar-se l'hemorràgia.

- Tècnica de Duke: tall a l'orella ($t < 3$ minuts).
- Tècnica d'Ivy: tall en l'avantbraç ($t < 6$ minuts).

El temps de sagnia depèn del número i funció de les plaquetes, la concentració de fibrinogen i la funció del vas, a part de les característiques del tall.

5.2.2.3 Recompte de plaquetes

Recompte de plaquetes al microscopi en cambra de recompte o en comptador automatitzat.

- $< 150 \times 10^9 / \text{L}$ Trombocitopènia asimptomàtica
- $< 50 \times 10^9 / \text{L}$ Hemorràgies espontànies

5.2.2.4 Mida de les plaquetes

La grandària de les plaquetes es pot observar en una pel·lícula de sang perifèrica.

- Volum normal: 7 - 10 fL
- Diàmetre normal: $2 \mu\text{m}$.

Un increment en el recanvi està associat a major volum, perquè les plaquetes recent formades a la medul·la òssia són més grans i la seva mida disminueix mentre envelleixen circulant en sang.

Les plaquetes grans també s'observen en algunes malalties genètiques com la síndrome de Bernard-Soulier.

A la síndrome de Wiskott-Aldrich les plaquetes són més petites del normal.

	Vasculopatia	Trombocitopenia	Trombopatia	Coagulopatia
Fragilitat	+	+	+	Normal
T sangria	Alt	Alt	Alt	Normal
Recompte	Normal	Baix	Normal	Normal

5.2.2.5 Temps d'agregació plaquetària

Es mesura la capacitat d'agents per induir l'activació i agregació de les plaquetes: la velocitat i magnitud.

Es tracta la sang amb citrat, el citrat quilarà el Ca. Es centrifuga la sang a baixes revolucions. Al sobredenant quedaran les plaquetes i s'afegeixen diferents elements (ADP, collagen, ristocetin, arauidonat) que induceixen l'agregació plaquetària i es monitora l'absorbància. A mida que les plaquetes s'agregen, la intensitat de llum que travessa la mostra és superior. Es deixa una alíquota sense addició d'agent activador per valorar l'agregació espontània.

El significat diagnòstic és el següent:

- L'agregació està disminuïda quan les plaquetes són disfuncionals.
- La resposta als agents agregants és diferent segons l'origen de la disfunció.

Una resposta deficient a ristocetin i normal a altres agonistes indica deficiència en el complex GPIb-IX-V (síndrome de Bernard-Soulier) a les plaquetes o en el factor de von Willebrand (FvW) a plasma. La resposta a araquidonat està disminuïda en la intoxicació per aspirina.

5.3 Hemostàsia secundària/Coagulació proteica

El trombe blanc és inestable. Intervenen factors proteics, Ca, vitamina K.

5.3.1 Proteïnes i factors de coagulació

Els factors proteics poden ser zimògens activats per Serina proteases. La major part dels factors de coagulació es sintetitzen al fetge.

- Factor III, *tissue factor* o tromboplastina es produeix al teixit danyat i a les plaquetes activades.
- El Factor IV o Ca ve dels ossos, de la dieta, de les plaquetes.

-
- Factor VIII: plaquetes i cèl·lules endotelials. La deficiència produeix hemofília.
 - Factor XVI o de von Willebrand: plaquetes i subendotelii.

Els co-factors són el III (VIIa), el V (pro-trombinasa), el VIII (tenasa), el factor XV (XI, XII) i la proteïna S.

Factor IX dóna hemofília B, factor XI dóna hemofília C.

5.3.2 Cascada de coagulació

Hi ha 2 vies d'activació de la trombina:

- Intrínseca: El dany del vas activa zimògens, que convergeixen al factor X.
- Extrínseca: El trauma activarà el tissue factor, i s'activarà el factor X.

Intervenen Ca i fosfolípids de la superfície de les plaquetes.

El factor Xa i Va, que juntament amb fosfolípids i Ca formen el complex de la pro-trombinasa (activa la protrombina a la trombina).

El factor X s'activa per la tenasa. Hi ha dos complexes de tenasa:

1. VIIa i TF formen el complex de la tenasa extrínseca
2. IXa i VIIIa formen el complex de la tenasa intrínseca. Intervé el vWF, que estabilitza el factor VIII.

La via principal és l'extrínseca. La via intrínseca no és la més important en la iniciació de la coagulació. El complex de la tenasa extrínseca activa el factor IX, que activa la tenasa intrínseca.

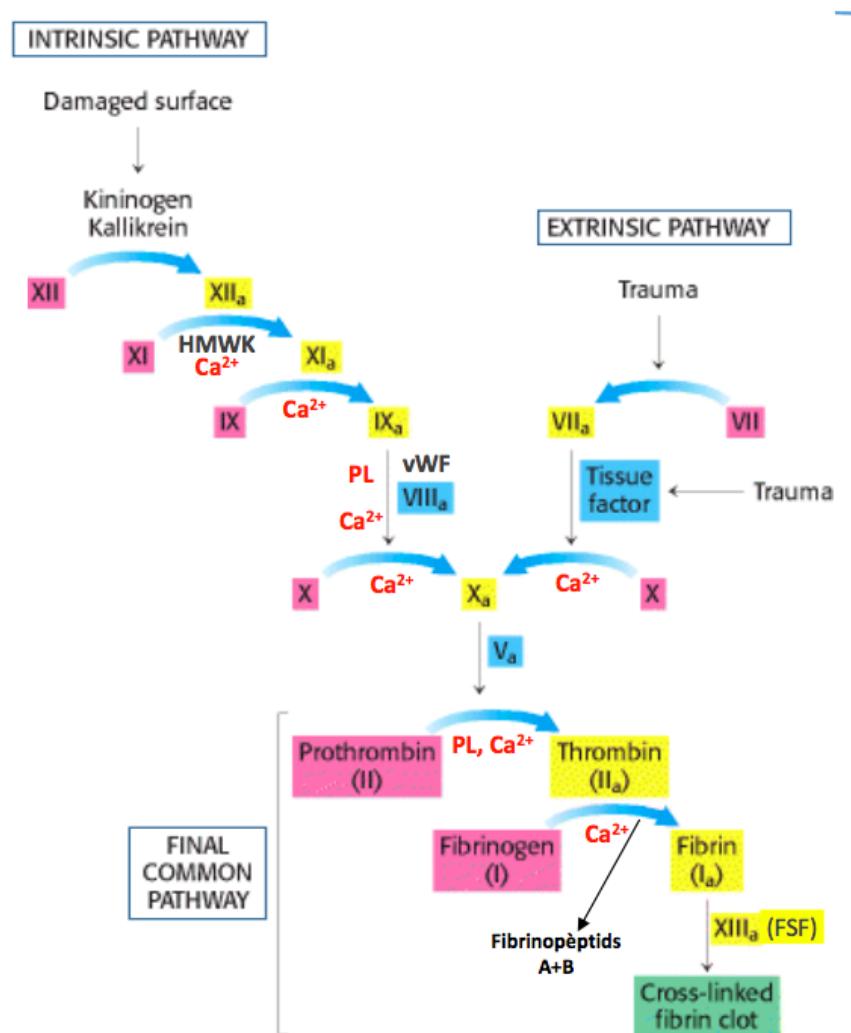


FIGURA 5: Visió clàssica de la cascada de coagulació

5.3.3 Tipus de factors de coagulació i mecanismes d'activació

Els factors de coagulació poden ser:

- Zimògens: II, IX, X, XI, XII, XIII
- Acceleradors: V, VII, VIII
- Co-factors: Ca²⁺, PL, vitamina K

5.3.3.1 Vitamina K

La vitamina K és liposoluble. Hi ha dues formes naturals, la vitamina K1 (filoquinona) que és abundant en vegetals verds i cereals i la vitamina K2 (menaquinona) produïda per bacteris en aliments fermentats i flora intestinal. Les formes sintètiques són les vitamines K3, K4 i K5.

Al fetge hi ha la epòxid reductasa que recicla la vitamina K oxidada i la redueix. La reducció és necessària per carboxilar factors de coagulació. El Ca s'uneix a aquests factors gamma-carboxilats. El Ca fa de pont entre fosfolípids i factors de coagulació.

La vitamina K (forma reduïda) és necessària per l'activitat de l'enzim γ -glutamil carboxilasa que transforma els residus de glutamat en γ -carboxiglutàmic que és un lloc d'unió per calci i necessari per la correcta funcionalitat de diversos factors de coagulació.

La deficiència en vitamina K és estranya, té lloc en malalties intestinals que impedeixen l'absorció o tractaments llargs amb antibiòtics. La vitamina K a dosis farmacològiques s'utilitza per tractar les deficiències i té també efectes beneficiosos en l'osteoporosi i càncer.

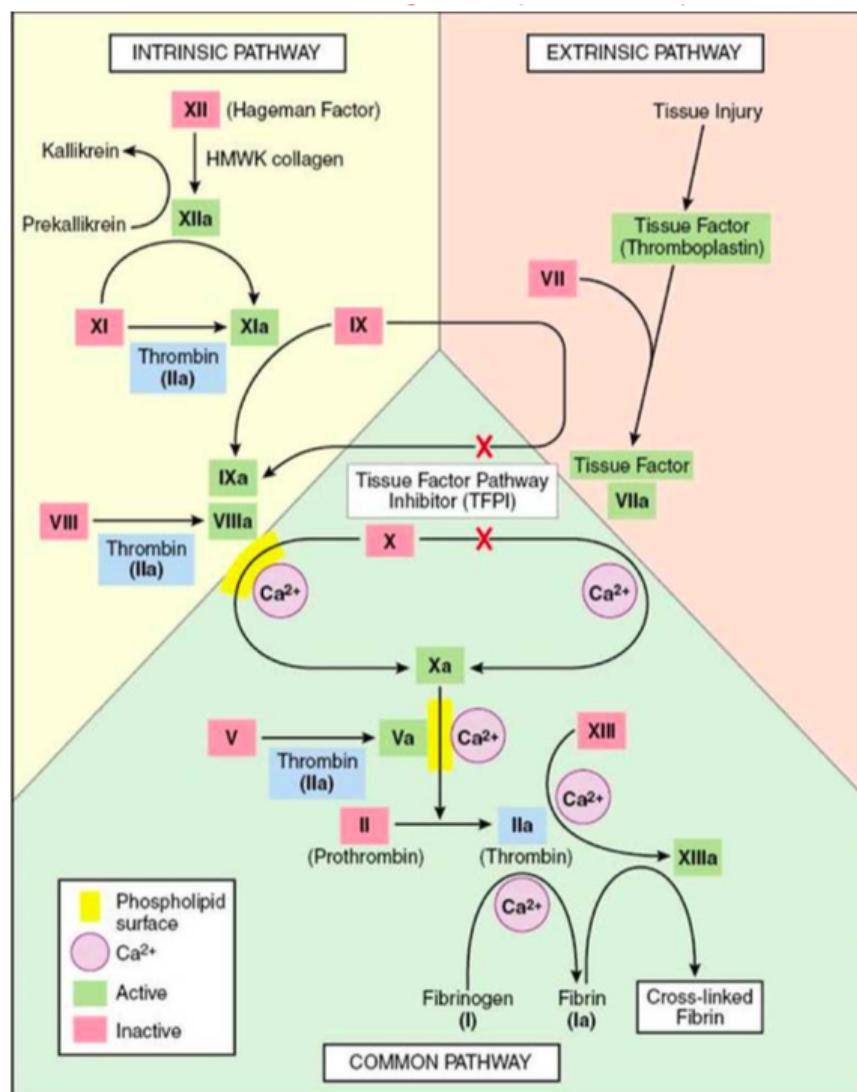
Diversos anticoagulants orals com la warfarina o el Sintrom actuen per bloqueig de la reducció i per tant reciclatge i disponibilitat de la vitamina K.

5.3.4 Visió actual de la coagulació

Hi ha circuits d'activació i inhibició per feedback. El factor XIII s'entrecreua amb la fibrina i estabilitza el coàgul.

Es sintetitza com a prepro-protrombina. Hi ha una proteòlisi que elimina el pèptid senyal. Després, la pro-protrombina és dependent de vitamina K. S'elimina el propèptid i finalment la protrombina pateix proteòlisi i genera la trombina.

Després de la iniciació de la cascada, el senyal es propaga i s'amplifica.



5.3.5 Formació del coàgul proteic

El fibrinogen és una proteïna soluble per la presència de pèptids rics en aminoàcids ionitzables que creen repulsió intermolecular. La hidròlisi d'aquests pèptids (per trombina) genera la fibrina amb alta capacitat d'agregació.

El procés finalitza amb l'establiment d'enllaços intermoleculars en la fibrina per acció del factor XIIIa (FSF: Fibrin-Stabilizing Factor).

La coagulació proteica consolida el trombe plaquetari.

5.3.6 Inhibició fisiològica de la coagulació

1. L'antitrombina (AT) s'uneix a la trombina o al factor Xa per un enllaç covalent i les inhibeix irreversiblement. Els complexos són eliminats pel fetge. AT és capaç d'inhibir totes les proteases activades durant la coagulació, encara que a un menor grau. L'AT és d'origen hepàtic.
2. La unió de la trombina al seu receptor trombomodulina (TM) permet la conversió de la proteïna C en proteïna C activada. La proteïna C activada s'uneix a la proteïna S i formen un complex que degrada els factors Va i VIIIa. Les proteïnes C i S són produïdes pel fetge.
3. Els productes de degradació de la fibrina (PDFs) inhibeixen la trombina.
4. TFPI (tissue factor pathway inhibitor) produït per les cèl·lules endotelials, inhibeix al factor Xa i la trombina.

5.4 Fibrinòlisi

El sistema fibrinolític dissol els coàguls petits i inadequats i també els que estan localitzats en llocs danyats un cop el vas sanguini s'ha recuperat. La dissolució del coàgul s'anomena fibrinòlisi.

Quan es forma un coàgul, s'hi incorpora el plasminogen. Tant els teixits del cos com la sang contenen substàncies capaces d'activar el plasminogen en plasmina o fibrinolisina, que és l'enzim plasmàtic actiu. Entre aquestes substàncies estan la trombina, el factor XII activat i l'activador tissular del plasminogen (t-PA9), sintetitzat per les cèl·lules endotelials de la major part dels teixits i s'allibera a la sang. El plasminogen també es pot activar per la uroquinasa (uPA). Un cop es forma la plasmina, pot dissoldre el coàgul dirigint la fibrina i inactivant substàncies com el fibrinogen, la protrombina i els factors V i XII.

Encara que la trombina té un efecte de retroalimentació positiva sobre la coagulació, aquesta queda limitada al lloc del dany. El coàgul no s'estén més enllà de la ferida cap a la circulació sistèmica, en part perquè la fibrina absorbeix a la trombina. Una altra raó per la limitació és que, donada la dispersió d'alguns dels factors de coagulació en la sang, les seves concentracions no són suficientment elevades com per provocar una coagulació disseminada.

A més; hi ha substàncies que retarden, suprimeixen o impedeixen la coagulació. La proteïna C activada (PCA) és un anticoagulant que inactiven els dos factors majoritaris no bloquejats per l'antitrombina i potencia l'activitat dels activadors del plasminogen.

5.4.1 Patologies relacionades amb la coagulació i la fibrinòlisi

5.4.1.1 Dèficits congènits en factors de coagulació. Hemofílies

La deficiències en el factor XII són asimptomàtiques. Les deficiències en els altres factors de coagulació plasmàtics són causa d'hemorràgies espontànies o post-traumàtiques. Són malalties autosòmiques recessives excepte les dels factors VIII, IX i vWF de tipus 1 i 2. Les deficiències més prevalents són:

- Hemofília A (factor VIII), el 45% és per inversió del gen.
- Hemofília B (factor IX)
- Malatia de von Willebrand -vWD -(vWF), varis subtipus

Les hemofílies A i B, clínicament indistingibles, presenten herència recessiva lligada al cromosoma X. Es manifesten en homes i en dones homozigots. Les dones heterozigotes poden tenir manifestacions lleus de la malaltia (per inactivació aleatòria del cromosoma X normal amb mosaic d'expressió del cromosoma X molt desfavorable). El factor de von Willebrand s'uneix al factor VIII i el concentra en els llocs de l'hemostàsie; també ajuda a que les plaquetes s'adhereixin a les parets dels vasos sanguinis i a que s'adhereixin entre elles. Els tipus 1 i 2 de vWD presenten herència autosòmica dominant, la del tipus 3 és autosòmica recessiva.

El tractament es fa per teràpia substitutiva del factor deficient (FVIII recombinant, plasma enriquit...).

Un altre dèficit congènit és el de fibrinogen.

A més de les hemofílies, hi ha altres dèficits no congènits; que són alteracions secundàries o adquirides:

- Insuficiència hepàtica
- Dèficit de vitamina K
- Dèficit de Ca^{2+}

5.4.1.2 Hipercoagulabilitat

La hipercoagulabilitat és la formació excessiva o en un lloc erroni de coàguls vasculars (trombosi). El tromb que es desplaça a un altre punt del sistema vascular on s'ha originat és un èmbol i pot obstruir el vas causant tromboembòlia.

Pot tenir diferents orígens:

- **Lesió endotelial:** s'exposa el subendotel i la inflamació que fa que les citoquines estimulin la producció del factor III.

-
- Traumatismes
 - Cirurgia
 - Aterosclerosi
- **Factors hemàtics:** Augment de la viscositat de la sang
 - Elevació de plaquetes (trombocitosi), eritròcits (policitèmia) o factors de coagulació.
 - Hiperreactivitat de les plaquetes (adhesió, agregació i activació incrementades).
 - **Alteració dels factors de coagulació**
 - Deficiència congènita en antitrombina III, proteïna C o S.
 - Disfibrinogenèmia o displasminogenèmia.
 - Polimorfisme del Factor V (Arg506->Gln, Factor V Leiden) que resulta en inactivació alentida per la proteïna C activada.
 - Síndrome antifosfolípid, degut a la presència d'anticossos que uneixen fosfolípids de la membrana cel·lular i estimulen la formació del coàgul. Aquests anticossos *in vitro* tenen l'efecte contrari, alenteixen APTT i per això s'anomenen Lupus anticoagulant.
 - Increment de PAI-1 que impedeix la fibrinòlisi.
 - Disminució de tPA o d'altres activadors del plasminogen.
 - **Descompensació en tractaments antihemorràgics**
 - **Factos hemodinàmics:** Fluc circulatori lent.
 - Sedentarisme
 - Dilatacions venoses (varius) per embaràs, edat, estrògens...
 - Compressions venoses (postura, mitjons, origen tumoral,...)
 - Cardiopaties

La coagulació disseminada intravascular (DIC) és una activació patològica de la coagulació que forma petits coàguls de sang dins dels vasos sanguinis en tot el cos i consumeix els components de la coagulació. Es produeix en resposta a la presència de tòxics a la sang, infeccions, traumes o càncer.

5.4.2 Tests per avaluar la coagulació i la fibrinòlisi

El **temps de coagulació** és una prova que es fa en plasma citratat i sense plaquetes i mesura el temps de formació del coàkul de fibrina per espectrofotometria o altres tècniques.

- **APTT o PTT:** S'addiciona Ca^{2+} (CaCl_2), caolí (mineral) que activa el sistema de contacte, i cefalina (fosfolípid). S'anomena també test de la cefalina per això. Mesura la via intrínseca. Els valors normals són de 25-40 segons. S'usa per diagnosticar trastorns d'hemorràgia i per monitoritzar la teràpia amb heparina.
- **Temps de trombina:** S'addiciona trombina. Mesura l'absència o alteració de fibrinògen o bé la presència d'anticoagulants tipus antitrombina.
- **Temps de reptilasa:** S'addiciona reptilasa (activitat similar a trombina però resistent a la inhibició per heparina o PDFs). Avalua la funcionalitat del fibrinogen i efectors antitrombina. La reptilasa es purifica del verí de la serp *Bothrops atrox*, actua separant el fibrinopèptid A del fibrinogen i deixa el fibrinopèptid B.
- **Temps de Quick:** S'addiciona Ca^{2+} (CaCl_2) i factor III (tromboplastina, TF). Mesura la via extrínseca. El temps normal és de 10-15 segons. S'usa per avaluar els trastorns de coagulació. Serveix per monitoritzar els tractaments amb warfarina i Sintrom.

L'International normalized ratio (INR), per estandarditzar variacions degudes a diferents activitats dels lots de FIII. La dosi del fàrmac s'ajusta per mantenir l'INR en els valors de referència. A l'inici del tractament, el monitoratge i control de la coagulació és més freqüent i a mesura que els nivells de coagulació s'han estabilitzat els controls s'aniran espaiant en el temps (3-4 setmanes).

- **Temps de coagulació (test de barreja):** Test realitzats en plasma citratat i utilitzats per distingir entre deficiències de factors i presència de factors inhibidors (Lupus anticoagulants o anticossos específics contra factors). Es barreja el plasma del pacient 1:1 amb un plasma normal que conté 100% del factor. El factor es trobarà per tant a una concentració superior 50% en la barreja.
 - Normalitzat: Que el temps de coagulació es corregeixi amb la barreja de plasmes indica deficiència de factor.
 - No normalitzat: La manca de correcció del temps de coagulació amb la barreja de plasmes indica presència d'un inhibidor.

Les proves de fibrinòlisi es basen en el temps de lisat:

- **Titulació de productes de degradació del fibrinogen (PDF):** Els PDFs inhibeixen la trombina. Es realitza amb partícules de làtex que porten un anticòs específic. Si augmenten aquests productes vol dir hi ha més fibrinogenòlisi, fibrinòlisi o ambdues.

-
- **Temps de lisi del coàgul de fibrina:** Es realitza amb sang coagulada (o plasma) en un tub de vidre a 37°C. La lisi no s'ha de produir abans de 4h.
 - **Temps de lisi d'eoglobines (ELT):** Es precipiten les eoglobines (fibrinogen, PAI-1, tPA, plasminogen, α 2-antiplasmina, FVIII) a pH 5,2 (acètic) d'un plasma citratat. Es resuspenen i es coagulen amb CaCl₂ a 37°C. Es mesura el temps fins a la desaparició del coàgul superior a 180 min, en intervals de 10 min. També es pot mesurar espectrofotomètricament.

5.4.3 Tractament antitrombòtic

Els tractaments afecten diversos nivells de la hemostàsie:

- **Fibrinolítics o trombolítics** (degraden directament el trombe)
 - Convencionals: estreptoquinasa o uroquinasa
 - De nova generació: tPA, prouroquinasa, ...
- **Antiagregants o antiplaquetaris:** aspirina, tifusal, dipiridamol, ...
- **Anticoagulants**
 - *Heparines:* vigilar si les heparines produueixen trombocitopènia. El control hemostàtic es duu a terme per APTT (Tiems de tromboplastina parcial).
 - *Antivitamines K:* Disminueixen el factor II, VII, IX i X.
 - * Varfarin: warfarina sòdica; Sintrom: acenocumarina
 - * Controls imprescindibles INR (Ratio Internacional Normalitzat)
 - INR = TQpacients/TQcontrol (Test de Quick)
 - 1.6 < INR < 2.5
 - INR < 1.6: S'ha d'augmentar la dosi
 - INR > 2.5: S'ha de disminuir la dosi

6. Hemoglobina i ferro

6.1 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)

6.1.1 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·losterisme 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).

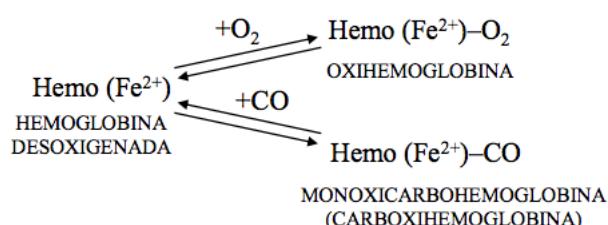
La hemoglobina presenta diferents subunitats segons l'estadi de desenvolupament de l'individu:

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

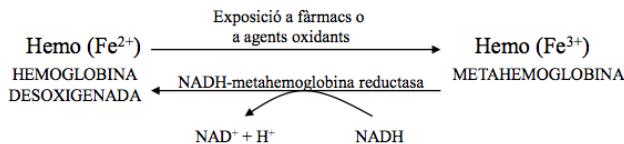
Hi ha 2 loci d' α -globina al cromosoma 16 i un locus de β -globina al cromosoma 11.

6.2 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.

6.3 Trastorns a la síntesi de la globina

6.3.1 Hemoglobinopaties estructurals

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

6.3.1.1 Hemoglobina S. Anèmia drepanocítica

Es dóna un canvi d'aminoàcid Glu->Val a la cadena beta. És insoluble a baixes pressions de O_2 . 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 Africa 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'agreua amb oxidants.

Altes concentracions d'HbS d'afinitat baixa per O_2 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 infeccios. Si es fa una transfusió quan es dona la primoquina ja que és oxidant i es pot agreujar l'anèmia.

6.3.1.2 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 6: Composició parcial en aminoàcids en la cadena β humana normal i algunes hemoglobines amb cadenes β anormals. Altres hemoglobines tenen cadenes α anormals.

6.3.1.3 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).

6.3.1.4 Metoglobinèmia

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

Ens podem trobar:

- Metoglobinèmia adquirida: Producida per fàrmacs, oxidants...
- Metoglobinèmia 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.

6.3.2 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.

6.3.2.1 β -Talassèmies

La síntesi de la cadena β 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 HbA_2). 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.

6.3.2.2 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 hidropsia 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 O₂ (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 A₂ ($\alpha_2\delta_2$): 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 O₂, 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 O₂, és molt afí i no el pot alliberar. Es troba augmentada en α^0 -talassèmia.

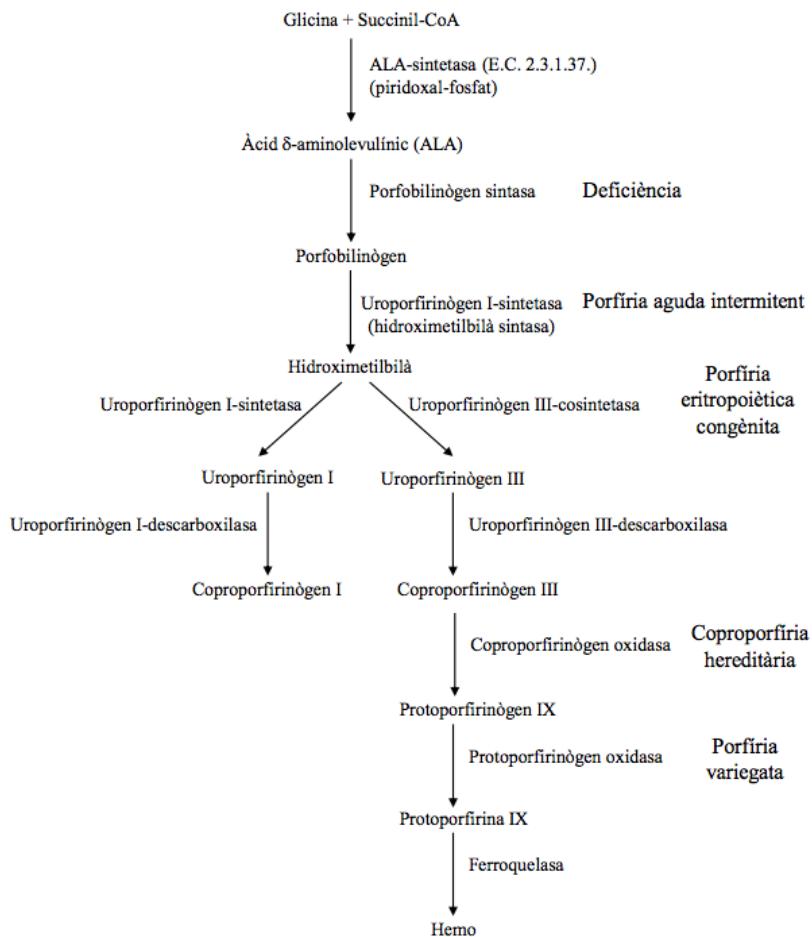
6.4 Desordres de la síntesi del grup hemo

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

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

Síntesi del grup hemo

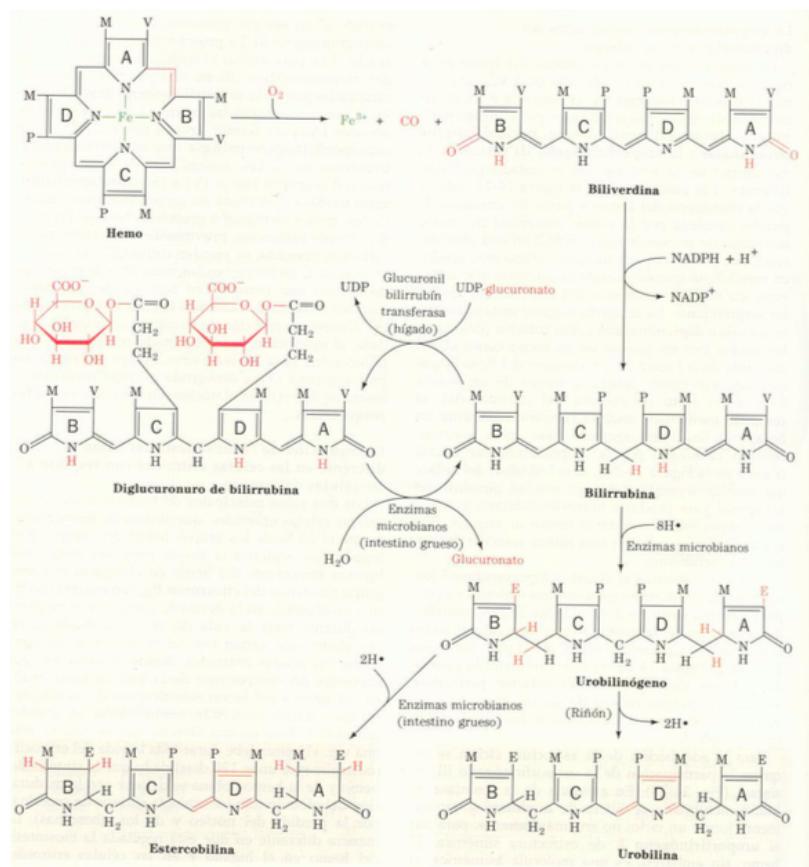
La glicina és un dels precursores principals de les porfirines. La síntesi de porfirines permet la formació dels grups hemo. Un dels intermediaris d'aquesta síntesi és el porfobilinogen que és un cromòfor.



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.



6.4.1 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 eritropoiètica
 - (c) Porfíria congènita

6.4.1.1 Porfíries agudes

N'hi ha 3:

6.4.1.1.1 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 bioquímic 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.

6.4.1.1.2 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 → protoporfirina, una inducció de ALA-sintetasa o les dues coses a la vegada.

6.4.1.1.3 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.

6.4.1.2 Porfíries no agudes

En trobem 4:

6.4.1.2.1 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, ingestió de hexaclorobenzè).

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

6.4.1.2.2 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.

6.4.1.2.3 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.

6.4.1.2.4 Intoxicació per plom

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

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

Els análisis 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.

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

FIGURA 7: 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 8: 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 coproporfirinogen

La determinació d'**ALA i PBG** es fa pel mètode de Watson (1941). El PBG es condensa amb p-dimetil-aminobenzaldehid en àcid clorhídrat (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.

6.5 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
Eritrocit	
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 9: Valors de referència de la concentració d'hemoglobina

Els eritròcits són discs bicòncaus de $2 \mu\text{m}$ d'amplada i $7 \mu\text{m}$ 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 eritropoiesis:
 - 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 déficit 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

6.5.1 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'eritropoèsi (asincronia madurativa entre nucli i citoplasma de cèl·lules precursores de l'eritròcit). L'eritropoèsi 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.

6.5.1.1 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.

6.5.1.2 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:

- Excreció no alterada de cianocobalamina (11-30% per ^{58}Co i per ^{57}Co). Deguda a:
 - Deficiència alimentària de cianocobalamina (iguals que en individus sans: excreció de cianocobalamina disminuïda, sense canvis en administrar el factor intrínsec (< 4% per ^{58}Co i per ^{57}Co)
 - Síndrome de malabsorció
 - Malabsorció secundària a anomalies intestinals o pancreàtiques
 - Infecció per *Dibothrioccephalus latus*
 - Deficiència de transcobalamina II
- Excreció de cianocobalamina disminuïda amb augment de la seva eliminació després d'administrar el factor intrínsec (5% per ^{58}Co i 5-14% per ^{57}Co). Degut a:
 - Anèmia perniciosa
 - Gastrectomia
 - Anticossos contra el factor intrínsec al suc gàstric

6.5.2 Anèmies hemolítiques

La vida mitjana d'un eritròcit és de 120 dies. L'hemòlisi és l'eliminació d'eritròcits per cèl·lules del sistema mononuclear-fagocític. Hi ha 2 tipus:

- **Hemòlisi extravascular.** En teixits amb alta activitat fagocítica de macròfags (melissa, medul·la òssia i fetge)
- **Hemòlisi intravascular.** En alguns casos, la hemòlisi és a la sang, que alliberen la hemoglobina, que s'uneix ràpidament a la cadena α de la haptoglobina i és captada pel fetge.

En l'anèmia hemolítica, hi ha una hemòlisi intravascular molt activa deguda a defectes intraeritrocitaris i a factors externs de l'eritròcit.

Es sobrepassa l'activitat del fetge per sintetitzar haptoglobina. Es troba:

- Augment d'Hb en plasma
- Augment de bilirubina no esterificada en plasma
- Si la Hb en plasma és superior a 0,1 mM hi haurà hemoglobinúria
- Augment de Fe³⁺ durant el període hemolític, a la fase regenerativa pot disminuir

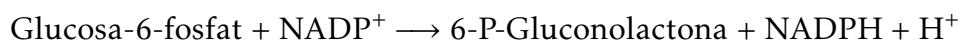
La hemoglobina s'oxida a metahemoglobina. La metahemoglobina es dissocia i allibera hematina. La hematina forma un complexe amb l'àlbumina (metahemàlbumina) o és eliminada amb la hemopexina (una β-globulina hepàtica).

6.5.2.1 Anèmies hemolítiques degudes a dèficits enzimàtics

Són anèmies cròniques degudes a la deficiència d'algún enzim eritrocitari en les quals l'eritròcit no presenta anomalies morfològiques. El procés hemolític té causes ambientals, que es pot identificar per la presència d'hemoglobinúria.

6.5.2.1.1 Dèficit de glucosa-6-fosfat deshidrogenasa

És el dèficit enzimàtic més freqüent. L'activitat G6PDH és un 15% inferior del normal. Afecta especialment a negres, al sud de la Xina i als països mediterranis. Presenta un patró d'herència associat al sexe. Es creu que aquest defecte pot protegir contra la malària



El NADPH als eritròcits redueix el glutatió i protegeix dels peròxids tòxics. Com que hi ha deficiència en glucosa-6-fosfat deshidrogenasa provoca un augment de metahemoglobina.

Les persones amb aquesta deficiència poden presentar anèmia hemolítica quan:

- Ingesta de faves (favisme)
- Ingesta de primaquina (antipal·lúdic)
- Processos infecciosos

6.5.2.1.2 Dèficit de piruvat quinasa

És un defecte hereditari autosòmic recessiu, que afecta sobretot a Europa i Amèrica.

Els eritròcits presenten dificultats de conservar quantitats adequades de ATP en el seu interior.

6.5.2.2 Anèmies hemolítiques autoimmunes

Es generen autoanticossos que causen hemòlisi extravascular. Poden ser degudes a:

- Incompatibilitat de grup sanguini ABO o Rh
- Infeccions víriques que alteren la superfície de l'eritròcit
- Administració de fàrmacs que s'uneixen a la membrana de eritròcits

6.5.2.2.1 Anèmia hemolítica amb anticossos calents

Els “anticossos calents” són els que actuen a la temperatura corporal Són IgG no fixadores de complement.

Augmenta la fragilitat a l’osmosi, fet que provoca la hemòlisi. Els indicadors bioquímics són:

- Augment de bilirubina no esterificada al plasma
- Augment de LDH plasmàtic
- Augment d’uroobilinogen en orina

La prova de Coombs és una prova que busca anticossos que puguin fixar-se als glòbuls vermells i causar la seva destrucció prematura.

La prova de Coombs directa s'utilitza per detectar anticossos que ja s'han fixat a la superfície dels glòbuls vermells. Moltes malalties i fàrmacs poden provocar que això passi. Aquests anticossos algunes vegades destrueixen els glòbuls vermells i provoquen anèmia. El seu proveïdor d'atenció mèdica pot recomanar aquest examen si vostè té signes o símptomes d'anèmia o icterícia (color groguenc a la pell o els ulls).

La prova de Coombs indirecta busca anticossos que estan surant en la sang. Aquests anticossos podrien actuar contra determinats glòbuls vermells. Aquest examen gairebé sempre es fa per determinar si vostè pot tenir una reacció a una transfusió de sang.

Un resultat normal es coneix com un resultat negatiu. Això vol dir que no hi va haver agrupació de cèl·lules i que vostè no té anticossos per als glòbuls vermells.

6.5.2.2.2 Anèmia hemolítica amb anticossosfreds

Els “anticossosfreds” són crioaglutinines (que actuen a baixa temperatura). Són IgM fixadores de complement. Tenen la màxima activitat a 4°C.

Al diagnòstic es detecten les crioaglutinines. La prova de Coombs directa dóna resultats positius.

6.5.2.2.3 Anèmia hemolítica provocada per fàrmacs

A vegades el fàrmac actua com haptè i l??eritròcit com a portador. Es produeixen anticossos fixadors de complement, que produeixen la hemòlisi.

Altres vegades, els anticossos contra els fàrmacs actuen com “anticossos calents”, que produeix la hemòlisi.

6.6 Metabolisme del ferro

En condicions normals, el Fe^{3+} i el Fe^{2+} té una concentració de 70 mmol. Es troba:

- 80% en hemoglobina, mioglobina i citocroms
- 20% en proteïnes de reserva (ferritina, hemosiderina)
- 0,1% en proteïnes de transport (transferrina)

El ferro absorbit en una dieta equilibrada (20-40 μmol) és similar a l'excretat. Una dieta equilibrada d'entre 10,5 i 12,5 kJ aporta 200-400 μmol de ferro. La carn, el peix i els cereals són els que aporten més ferro; els ous i les verdures en tenen menys.

Al duodè s'absorbeix el 10% del ferro ingerit. Els infants i les dones absorbeixen més ferro. Les dones han de compensar la pèrdua de la menstruació (uns 270 μmol al mes).

A les cèl·lules de la mucosa intestinal té lloc l'absorció del Fe, que després passa a la sang. Després, s'uneix a la transferrina que està saturada en un 30%. Cada transferrina fixa 2 ions Fe^{2+} . Després la transferrina s'uneix a un receptor específic i entra a la cèl·lula per pinocitosi. Els hepatòcits i els eritròcits són els que tenen més receptors de transferrina. Aquest Fe es destina a:

- 65% síntesi d'hemoglobina
- 10% síntesi de mioglobina
- 5% síntesi de citocroms
- 20% acumulació en ferritina i hemosiderina

Per altra banda, els principals dipòsits de ferro a l'organisme són:

- Macròfags de la medul·la òssia
- Melsa
- Fetge

6.6.1 Alteracions del metabolisme del ferro

Les alteracions del metabolisme del ferro poden ser per:

- Dèficit: Anèmia ferropènica
- Sobrecàrrega: Hemocromatosi

La disminució d'hemoglobina pot ser deguda a:

- 90% per dèficit de ferro (anèmia ferropènica)
- 10% per trastorn del metabolisme

- Arribada insuficient de ferro als eritroblasts
- Trastorns congènits de síntesi del grup hemo (anèmia sideroblàstica)

L'estudi bioquímic del ferro es basa en:

- [Fe²⁺] + [Fe³⁺] en plasma:** Hi ha variació intra i interindividual. En l'home és un entre un 15 i un 20% més elevada que en la dona. En la dona es produeixen variacions mensuals (menstruació). Segueix un cicle circadià. Disminueix en:
 - Estats d'anèmia ferropènica
 - Malalties infeccioses, inflamatòries cròniques i neoplàsies
- [Transferrina] en plasma:** És una glicoproteïna β_1 -globulina de 80000 g/mol. Es sintetitza al fetge i no té tantes fluctuacions com el ferro:
 - Augmenta en l'embaràs
 - Augmenta en estats d'anèmia ferropènica
 - Disminueix en síndrome nefròtic, malnutrició i malalties cròniques
- [Ferritina] en plasma:** Relacionada amb les reserves de ferro disponibles. Hi ha variabilitat biològica individual (6,5% menor que la del ferro). No presenta ritmes circadians.
 - Disminueix en l'anèmia ferropènica (abans que es manifestin els símptomes)
 - Augmenta en hepatopaties, malalties inflamatòries i neoplàsies
- [Protoporfirina (Zn)] en sang:** Indica la disponibilitat de ferro. En general la relació $\frac{\text{Protoporfirina(Zn)}}{\text{Hemoglobina(Fe)}}$ és baixa. En l'últim pas de síntesi s'incorpora el Fe²⁺. Disminueix en:
 - Anèmia ferropènica
 - Talassèmia, hepatopaties, neoplàsies, intoxicació per plom

6.6.2 Anèmia ferropènica

Poden ser:

- Anèmia per dèficit de ferro:** Poden ser fisiològiques provocades per pèrdues de sang com la menstruació en dones en estat fèrtil o en nens en creixement. També pot ser deguda a una alimentació deficient pobre en carn i vitamines.
- Anèmia secundària per pèrdua crònica de sang:** Pot tenir diverses causes:

-
- Patològiques: Lesions del tub digestiu
 - Benignes
 - * Varius esofàgiques (cirrosi hepàtica)
 - * Gastritis (ingesta excessiva d'antiinflamatoris)
 - * Ulcus gàstric o duodenal
 - * Hèrnia de hiat
 - * Tumors benignes (pòlips adenomatosos)
 - * Morenes (hemorroides)
 - Malignes
 - * Carcinoma gàstric
 - * Neoplàsies del budell prim
 - * Carcinoma de colon
 - Pèrdua per via genitourinària
 - Metrorragia per fibromatosis uterines
 - Infeccions
 - Neoplàsies
 - Diverticulosi
 - Vasculitis
 - Malaltia de Rendu-Osler
 - Hemosiderosis pulmonar idiopàtica
 - Donació repetida i voluntària de sang

3) Anèmia secundària per ingestà inadequada de ferro: Pot ser per:

- Dietes molt inadequades (països subdesenvolupats)
- Malalties de l'aparell digestiu
 - Aquilia gàstrica
 - Gastrectomia
 - Malaltia celíaca
 - Colitis ulcerosa
- En nens, la ingestà de substàncies que bloquegen l'absorció del ferro
 - Geofàgia
 - Ingesta de guix

6.6.3 Anèmia sideroblàstica

Està causada per una mala utilització del ferro a la síntesi del grup hemo. Pot ser:

- **Anèmia sideroblàstica hereditària:** Està lligada al cromosoma X.
- **Anèmia sideroblàstica secundària adquirida:** Pot estar causada per:
 - Ingesta d'etanol, plom, isoniazida, cicloserina, cloramfenicol
 - Sideroblasts en anell (amb hemosiderina al nucli) molt augmentats a la medul·la òssia
 - Acumulació de ferro al mitocondri
 - Augment de ferro en plasma
 - Augment de ferritina en plasma

6.6.4 Hemocromatosi

En aquest cas, es troben nivells elevats de ferro i ferritina plasmàtica. La transferrina està disminuïda en plasma. El diagnòstic es fa mitjançant una biòpsia hepàtica on s'examina el contingut de ferro dels hepatòcits amb una tinció immunohistoquímica.

Poden ser:

- **Hemocromatosi hereditària:** Té caràcter recessiu i s'ha associat amb l'antigen HLA-A3.
- **Hemocromatosi secundària:** Que pot ser deguda a:
 - Administració repetida de transfusions
 - Augment de l'absorció (degut a anèmia crònica)
 - Ingesta de ferro excessiva a la dieta
 - Hepatopatia crònica (cirrosi)

7. Enzimologia clínica

7.1 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 conformacionals) i es catabolitzen. Els enzims es destrueixen en fagòcits, melsa, endotelials, cèl·lules sanguínes.

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.

7.1.1 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.

7.1.2 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 katalis.
 - Activitat específica: Unitats de l'enzim per mil·ligram de proteïna
 - Activitat molecular o molar: Número de molècules de substrat trasformades 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'adecuar a les concentracions òptimes de l'enzim.

7.1.3 Distribució cel·lular dels enzims

Citosol	Mitocòndria	Membrana	Lisosoma
Alanina aminotransferasa Aspartat aminotransferasa (c) lactat deshidrogenasa Malat deshidrogenasa (c) Creatina quinasa	Aspartat aminotransferasa (m) Glutamat deshidrogenasa Malat deshidrogenasa (m)	Fosfatasa alcalina Gamma glutamil transferasa 5'-nucleotidasa	Fosfatasa àcida Glucosidasa

FIGURA 10: 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 històrica (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 ornitina-carbamoił-transferasa o iditol-deshidrogenasa.

7.1.4 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

Grup	Enzims
A. Utilitzats habitualment en la majoria dels laboratoris clínics	Fosfatasa alcalina, fosfatasa àcida, lipasa, amilasa, ASAT (GOT), ALAT (GPT), LDH, CPK (CK)
B. Clínicament útils, però no tant utilitzats com els anteriors	Seudocolinesterasa, LAP, 5'N, GGT, Ald, PHI, ICD, OCT, HBD, ID, LPS, D Hidroxibutirato deshidrogenasa
C. Principalment interessants en recerca; utilitzats en poques clíniques o en cap	α -Lecitinasa, LPL, aliesterasa, fructosa-6-aldolasa, MD, β -glucuronidasa, GD, guanasa, GR Lipoproteïna lipasa Glutamat deshidrogenasa Glutatona reducida
D. Utilitzades només en circumstàncies especials	Ceruloplasmina (per malaltia de Wilson), seudocolinesterasa (per enverinament amb insecticides o apnea prolongada per tractaments amb relaxants musculars), muramidasa (per leucèmia), ECA (per sarcoidosi) <small>Enzima convertidor de angiotensina</small>
E. Dades escasses per a ser utilitzats clínicament (o utilitat nul.la)	ATPasa (alcalina i àcida), heroinesterasa, procainesterasa, DNAses (I i II), colesterolesterasa, glucokinasa, fosfoglucomutasa, triosa-P-isomerasa, gliceralehid-3-P-deshidrogenasa, fosfoglycerat-deshidrogenasa, enolasa, 3-P-kinasade l'àcid glicèrid, piruvatkinasa, enzim màlic, fumarasa, succinat deshidrogenasa, G6PDH, 6-PGDH, ribosa-5-P-isomerasa, transketolasa, tripeptidasa, dipeptidases, oxitokinasa, aminooxidases, arginasa, adenosin-desaminasa, bencidinoxidasa

FIGURA 11: Enzims usats en clínica

7.2 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

7.2.1 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 substrat de la del producte.

7.2.2 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'absorbància 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'absorbància continuament durant un temps determinat.

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

7.2.3 Aplicació de tècniques enzimàtiques combinades

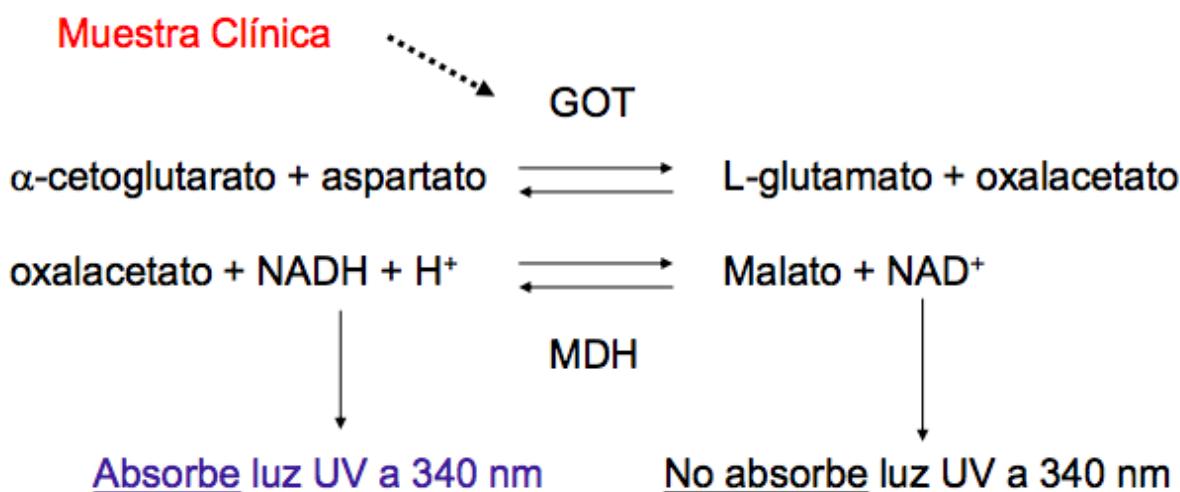
La concentració dels enzims és molt baixa (nmol) i per tant es mesura la seva activitat (o bé s'aplica immunoanàlisi).

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)

7.2.3.1 Determinació de l'aspartat aminotransferasa (GOT)

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



La pèrdua d'absorbància a 340 nm és proporcional a l'activitat GOT.

7.2.4 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.

7.3 Enzims marcadors habituals en enzimologia clínica

Els més freqüents són:

Enzim	Malaltia
Fosfatasa àcida	Carcinoma prostàtic
Fosfatasa alcalina	Fetge, malaltia òssia
Amilasa	Malaltia pancreàtica
gamma-glutamiltranspeptidasa	Malaltia hepàtica
Glutamat aminotransferasa	Fetge, malaltia cardíaca
Aspartat aminotransferasa	Fetge, malaltia cardíaca
Alanina transferasa	Fetge, malaltia cardíaca
Lactat deshidrogenasa	Fetge, cor, hematies
Creatina quinasa	Cor, múscul, cervell

TAULA 2: Enzims més freqüents i malalties relacionades

Alguns enzims (lactat deshidrogenasa, aldolasa, fosfohexoisomerasa, malat deshidrogenasa) es troben en múltiples teixits, pel que per reforçar el valor diagnòstic d'aquests enzims s'han d'analitzar els isoenzims.

El tamany dels enzims i la ubicació intracel·lular és molt important a nivell d'alliberació. L'alliberació citoplasmàtica és un dany reversible però el mitocondrial produueix afectacions agudes.

Altres enzims són en 1 o 2 teixits:

- Ornitin-carbamoil-transferasa, OCT; iditol deshidrogenasa, ID al fetge
- Creatina quinasa: al múscul esquelètic, miocardi i cervell
- Fosfatasa àcida: pròstata

L'augment dels enzims sèrics denota necrosi en malalties hepàtiques, pancreàtiques i miocàrdiques:

- Fosfatasa alcalina: malalties òssies i hepatobiliars
- Fosfatasa àcida: càncer de pròstata
- Amilasa, lipasa: pancreopaties
- Glutamat-oxalacetat-transaminasa (GOT) = aspartat-aminotransferasa (ASAT): malalties cardíques i hepàtiques
- Glutamat-piruvat-transaminasa (GPT) = alanina aminotransferasa (ALAT): malalties cardíques i hepàtiques

En el cas de la lactat deshidrogenasa hi ha diferents isoenzims:

-
- LDH1: Miocardi
 - LDH5: Fetge

L'aspartat aminotransferasa té 2 isoenzims hepàtics:

- AST1: Citosol, passa al plasma amb facilitat. Reflecteix canvis lleus a la membrana plasmàtica.
- AST2: És mitocondrial i el seu pas al plasma és complicat. Reflecteix lesions necròtiques als hepatòcits.

7.3.1 Pancreatitis

És una inflamació dels conductes pancreàtics. Incrementa l'alliberació d'enzims digestius pancreàtics com:

- α -amilasa pancreàtica
- Lipasa pancreàtica
- Tripsina

7.3.1.1 α -amilasa

És un component important de la saliva (S) i del suc pancreàtic (P). Els isoenzims S i P es poden separar per electroforesi. Són enzims de petit tamany que travessen el LCR i a orina, on es poden detectar.

Fins als 5 anys és indetectable i és un bon marcador de pancreatitis.

- **Pancreatitis aguda:** Augmenta l'amilasa en sèrum i orina en 3h. Torna a la normalitat en 5-10 dies.
- **Pancreatitis crònica i fibrosi quística:** Disminueix l'amilasa en sèrum-
- **Hiperamilasèmia:** Nivells alts d'amilasa en sang degut a:
 - Diabetis amb cetoacidosi
 - Intoxicació alcohòlica
 - Insuficiència renal crònica
 - Lesions en glàndules salivals
 - Malalties de tractes biliars i intestinals

La macroamilasa és un complex d'amilasa amb immunoglobulines o polisacàrids (no passa a orina).

7.3.2 Fosfatasa àcids. Carcinoma de pròstata

La fosfatasa àcida és un enzim que allibera grups fosfat a pH àcid. Mostra una activitat elevada en pròstata (10-100 cops més elevada que en altres teixits). Té isoformes en eritròcits, plaquetes i pròstata.

Augmenta molt en carcinoma de pròstata descapsulat. La isoforma prostàtica es pot distingir de les altres perquè és inhibible per tartrat.

7.3.3 Marcadors hepàtics

Els més importants són:

- Transaminases
- γ -glutamil transpeptidasa (marcador de membrana i canalicle biliar i d'alcoholisme)
- Fosfatasa alcalina

7.3.3.1 γ -glutamil transpeptidasa

Transfereix residus de glutamat d'un pèptid a un aminoàcid per transportar-lo a través de la membrana plasmàtica. Abunda a la membrana plasmàtica de les cèl·lules del tracte biliar, els túbuls renals i l'epiteli intestinal. La γ -glutamil transpeptidasa normal del plasma és l'hepatòtica.

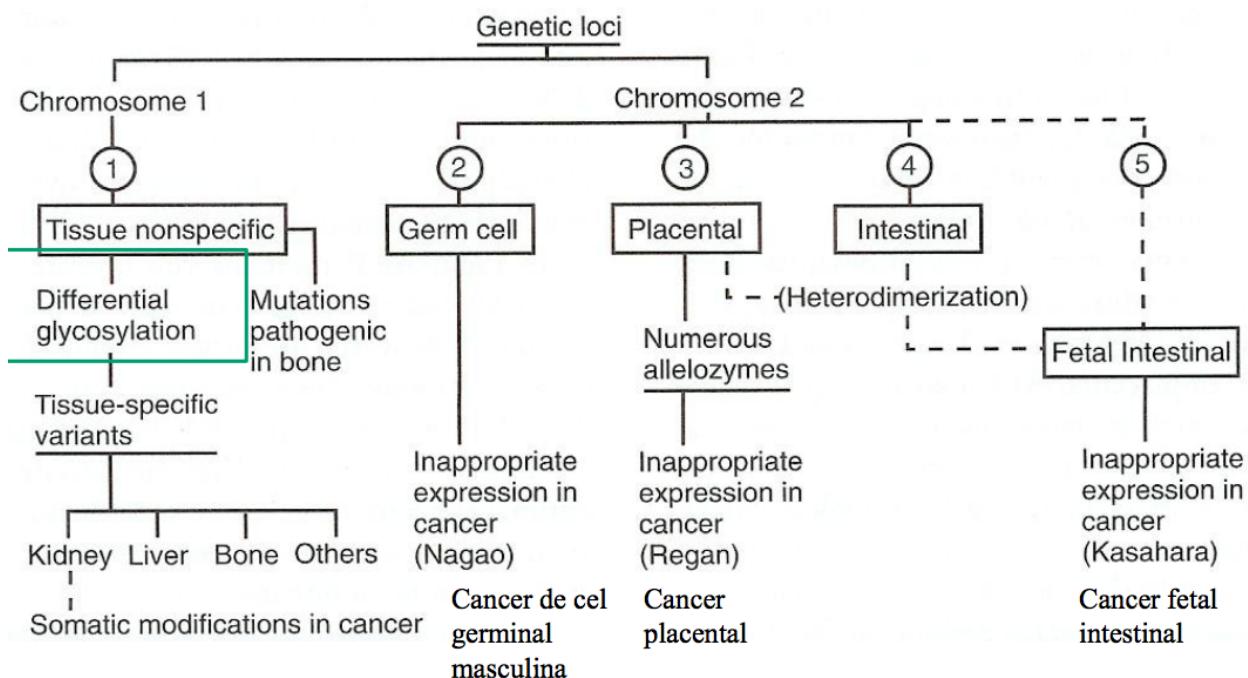
Els valors de referència són una mica elevats en nounats i en pacients obesos o alcohòlic. Hi ha diverses formes moleculars, no està clar si són isoenzims o productes de degradació. Augmenta molt en colestasis intra o extrahepatòtica. Augmenta però no tant en dany hepatocel·lular i també augmenta en alcoholisme, serveix com a control d'abstinença. Els nivells poden variar amb:

- Fàrmacs (anticonceptius i altres)
- Diabetis, hipertiroïdisme, artritis reumatoide, malalties renals...

7.3.3.2 Fosfatasa alcalina

Hi ha múltiples formes moleculars de fosfatasa alcalina que deriva de fetge, os o intestí.

Origins of Alkaline Phosphate Isoforms



De forma fisiològica, els nens i les embarassades (per la placenta) presenten una activitat elevada de fosfatasa alcalina.

De manera patològica, la fosfatasa alcalina es troba elevada en:

- Malalties hepàtiques (sensible però poc específic)
- Malalties òssies: Paget, osteomalàcia i osteomielitis
- Altres: alteracions endocrines, neoplàsiques o per fàrmacs

Malaltia hepatobiliar		Malaltia òssia		Altres processos	
Ictericia obstructiva	↑↑↑	Osteítis deformant	↑↑↑	Fractures en consolidació	↑
Cirrosi biliar	↑↑↑	Raquitisme	↑↑	Creixement normal	↑
Colestasi intrahepàtica	↑↑↑	Osteomalacia	↑↑	Embaràs (darrer trimestre)	↑
Lesions que ocupen espai (granulomes, abscessos, carcinoma metastàsic)	↑↑	Hiperparatiroidisme	↑↑	Hipofosfatàsia	↓
Hepatitis vírica	↑	Malaltia òssia metastàsica	↑↑	Malnutrició	↓
Mononucleosi infecciosa	↑↑	Sarcoma osteogènic	↑↑↑		
Cirrosi (alcohòlica)	↑				

Les isoformes difereixen en:

- Mobilitat electroforètica
- Inhibició diferencial (calor o inhibidors)
- Reconeixement per anticossos

-
- Especificitat de substrat i Km

De moment, els isoenzims no s'utilitzen pel diagnòstic. Si es tracta amb neuroamini-dasa, que trenca els sucres, i així poder separar les diferents isoformes d'os, fetge...

Malalties musculars

Hi ha 2 tipus:

- Malalties coronàries: Falta d'oxigen al miocardi
 - Infart de miocardi (isquèmia a les cèl·lules del cor)
 - Insuficiència cardíaca congènita
 - Angina de pit
- Malalties musculars: es trenquen les cèl·lules musculars i alliberen els seus enzims a la sang.
 - Distròfies musculars (Duchenne)
 - Poliomiocitosi (malaltia autoimmunitària)
 - Miopaties metabòliques hereditàries (enzims glicòlisi)

7.3.4 Infart de miocardi

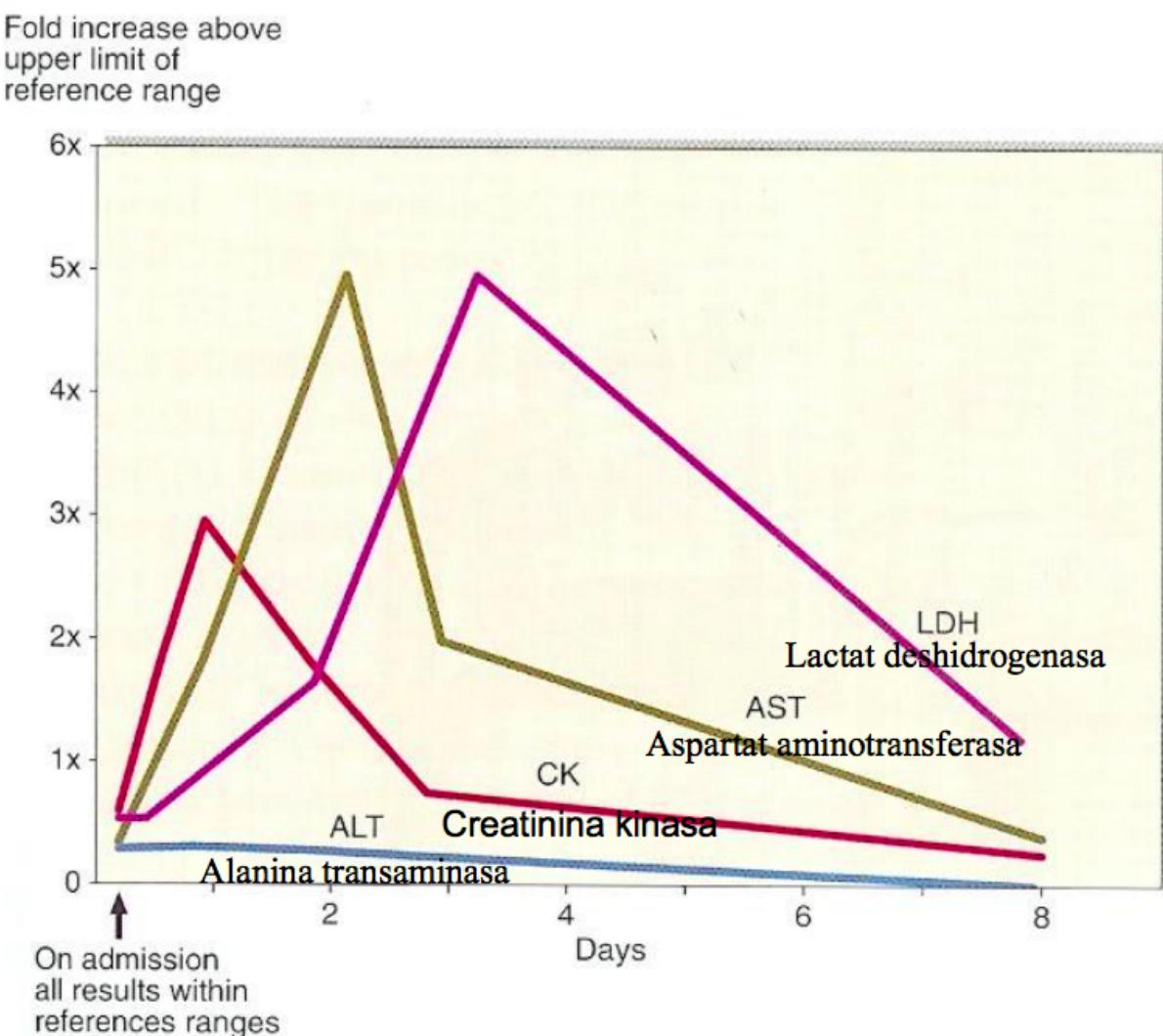


FIGURA 12: Canvis en la cinètica d'alguns enzims durant i post infart de miocardi

7.3.4.1 Creatina quinasa

La creatina és un substrat energètic del múscul. És un marcador primerenc de l'infart de miocardi.

És un enzim abundant al múscul esquelètic, al miocardi i al cervell. Augmenta molt en infart de miocardi, distròfia muscular, poliomiositis (miopatia inflamatòria idiopàtica), miopatia alcohòlica...

L'enzim és un dímer de 2 tipus de cadenes M i B, generant diferents isoenzims:

- BB (CK1): fetge, pulmó, ronyó, intestí, cervell
- MB (CK2): cor (25%)
- MM (CK3): cor (75%) i en múscul esquelètic. Més abundant en sèrum.

La detecció es pot fer per mètodes enzimàtics (CK totals), per electroforesi, cromatografia de bescanvi iònic i immunoinhibició.

La CK2 és específic de l'infart de miocardi. Augmenta després de 2-4 hores de l'infart amb un màxim d'activitat a les 12-36 hores. Es separa per electroforesi o cromatografia. Als 2-3 dies, la creatina quinasa ja disminueix.

La CK1 apareix en plasma quan hi ha carcinomes de pròstata, colon, pulmó i esòfag.

La CK3 (MM) apareix després de fer exercici intens.

La creatina quinasa catalitza aquesta reacció:



Els valors de referència en homes són superiors als de les dones (menys massa muscular en les dones).

La creatina quinasa també augmenta en:

- Afeccions musculars: rabdomiòlisis, polimiositis, dermatomiositis (miopatia inflamatòria idiopàtica), distròfies.
- Traumes: cremades, cirurgia, xoc elèctric
- Altres circumstàncies: hipotiroïdisme, administració d'algunes drogues
- Situacions lleus: administració d'injeccions, exercici físic intens

7.3.4.2 Lactat deshidrogenasa

És un marcador tardà d'infart de miocardi. És un enzim molt abundant en múscul, hematies (compte amb l'hemòlisi post extracció), fetge i ronyó.

Augmenta molt en anèmia megaloblàstica, carcinoma extès, xoc sever o hipòxia.

Augmenta en infart de miocardi o pulmonar, algunes leucèmies, algunes anèmies, mononucleosi infecciosa i distròfia muscular.

No augmenta gairebé en problemes hepàtics.

- Infart de miocardi: LDH puja més lentament que AST (aspartat transaminasa) i LDH es manté 10-14 dies.
- Infart pulmonar: Augmenta LDH i AST normal.

La LDH està formada per 4 subunitats H i/o M en un total de 135 kDa. Al sèrum normal predomina H_3M i després H_4, H_2M_2, M_3H i M_4 . En l'infart de miocardi, la forma H_4 predomina sobre la H_3M . La M_4 predomina en dany hepàtic o de múscul esquelètic.

La detecció es pot fer per mètodes enzimàtics (LDH total), per electroforesi (la isoforma H té major mobilitat), chromatografia de bescanvi iònic, immunoinhibició o assaigs calòrics (H_4 resisteix a 65°C durant 30 min).

La LDH fa la següent reacció:



Té una estructura terramèrica rica en triptòfan. Presenta una conformació β considerablement plegada. Cada monòmer fixa una molècula de tiroxina, que és una prealbúmina fixadora de tiroxina (PAFT), però la globulina és 100 vegades més afí per la tiroxina. Forma complexes amb la vitamina A, amb la prealbúmina fixadora de retinol (PFR).

7.3.4.3 Transaminases

Són enzims que passen un grup amino d'un oxoàcid a un aminoàcid.

- **AST o GOT o ASAT: aspartat aminotransferasa**
 - Augmenta en malaltia hepatobiliar, cardiovascular o muscular.
 - Augmenta en infart de miocardi i disminueix al 5è dia. L'augment és proporcional a la necrosi.
 - Augmenta en distròfia muscular i en triquinosis.
- **ALT o GPT: alanina aminotransferasa**
 - Augmenta en destrucció hepatocel·lular
 - No s'altera en problemes muscualars

AST i ALT també s'alteren en:

- Diabetis mellitus, mononucleosis, lupus, febre tifoidea, càncer, fàrmacs
- Valors baixos en situacions de déficit de la vitamina fosfat de piridoxal.

7.3.4.4 Marcadors no enzimàtics

En trobem de diferents tipus:

- **Mioglobina** (detectable a les 1-3h de l'infart)
- Cadenes lleugeres de la **miosina**
- **Tropònines I i T** (detectables de les 3-12h de l'infart, es mantenen elevades de 10-15 dies). Ajuden a la contracció de l'actina

Mecanisme	Exemple	Enzims	Comentaris
I. Nivells augmentats en el sèrum			
A. Alliberació augmentada			
1. Necrosis	Infart de miocardi	ASAT (GOT), LDH, ALS, MD, GR, CK, HBD, RNAsa i altres	
	Hepatitis aguda	ASAT (GOT), ALAT (GPT), OCT, ICD, ID, GD, LDH, ALS, PHI, MD, GR, FA, LAP i altres	Nivells augmentats d'alguns enzims (FA) poden representar un augment de la producció i la seva alliberació a partir de cèl·lules necròtiques i una excreció disminuïda
	Pancreatitis aguda	amilasa, lipasa, lecitinasa, tripsina, DNAsa I	
2. Permeabilitat augmentada: membranes cel·lulars sense necrosi	Distròfia muscular progressiva, delirium tremens, dermatomiositis	CK, ALS, PHI, MD, ASAT (GOT), ALAT (GPT)	
B. Augment de la font histica d'enzims; augment de l'alliberació a partir del teixit o ambdós	Malaltia neoplàstica (carcinoma, limfoma), leucèmia granulocítica	DL, ALS, PHI, MD, GR, glucuronidasa	
	Anèmia megaloblàstica	LDH, ALS, PHI, MD	Pot ser el resultat d'un augment en el nombre de megaloblasts, destrucció intramedular augmentada o d'ambdós
	Lesions osteoblàstiques (malaltia de Paget, sarcoma osteogènic, fractures en consolidació, raquitisme, ...)	FA, ATPasa	
C. Alteració en l'excreció d'enzims	Úlcera pèptica Urèmia	Pepsinògen Amilasa	Nivells augmentats d'amilasa, secundaris a fracàs renal i d'origen incert
	Ictericia obstructiva	FA, LAP, 5'N, GGT	Importància relativa d'una excreció disminuïda i una producció augmentada

Mecanisme	Exemple	Enzims	Comentaris
II. Nivells disminuïts en el sèrum A. Formació disminuïda			
1. Genètica	Hipofosfatasia Malaltia de Wilson Acolinesterasèmia	FA Ceruloplasmina Seudocolinesterasa	
2. Adquirida	Hepatitis Inanició	Seudocolinesterasa Amilasa (AMS)	
B. Inhibicions d'enzims	Enverinament amb insecticides	Sudocolinesterasa	
C. Manca de cofactors	Embaràs? Cirrosi?	ASAT	Deficiència en piridoxina o metabolisme deficient en aquest coenzim (?)

8. Disfuncions del metabolisme glucídic

8.1 Regulació de la concentració de la glucosa sanguínia

Els nivells normals de glucosa en sang són de 3,89-5,83 mmols/L (70-105 mg/dL).

Els ajustaments constants que mantenen els nivells de glucosa en sang prop de 4,5 mM són el resultat de l'acció combinada de la insulina, glucagó, adrenalina i cortisol sobre els processos metabòlics que tenen lloc en molts teixits corporals, però especialment al múscul, al fetge i al teixit adipós.

- **Insulina:** indica als teixits que els nivells de glucosa en sang són elevats, per sobre d'allò necessari, i per tant estimula la captació, la gluconeogènesi i la lipogènesi.
- **Glucagó:** transmet el missatge que els nivells de glucosa en sang són massa baixos, i els teixits responen generant glucosa per glicogenòlisi i gluconeogènesi (fetge) i oxidant els lípids per reduir el consum de glucosa.
- **Adrenalina:** s'allibera ràpidament en sang per preparar els músculs esquelètics, pulmons i cor per un esforç sobtat i important. El metabolisme s'ha d'adaptar ràpid, i es mobilitza més glucosa al múscul i a l'encèfal.
- **Cortisol:** facilita la resposta corporal a l'estrés de llarga durada (ansietat, por, dolor, hemorràgia, infeccions, hipoglucèmia, inanició). Permet subministrar a l'organisme el combustible necessari per afrontar l'estrés actuant sobre múscul, fetge i teixit adipós. És una hormona d'acció lenta que modifica el nivell d'expressió enzimàtic en les cèl·lules diana.

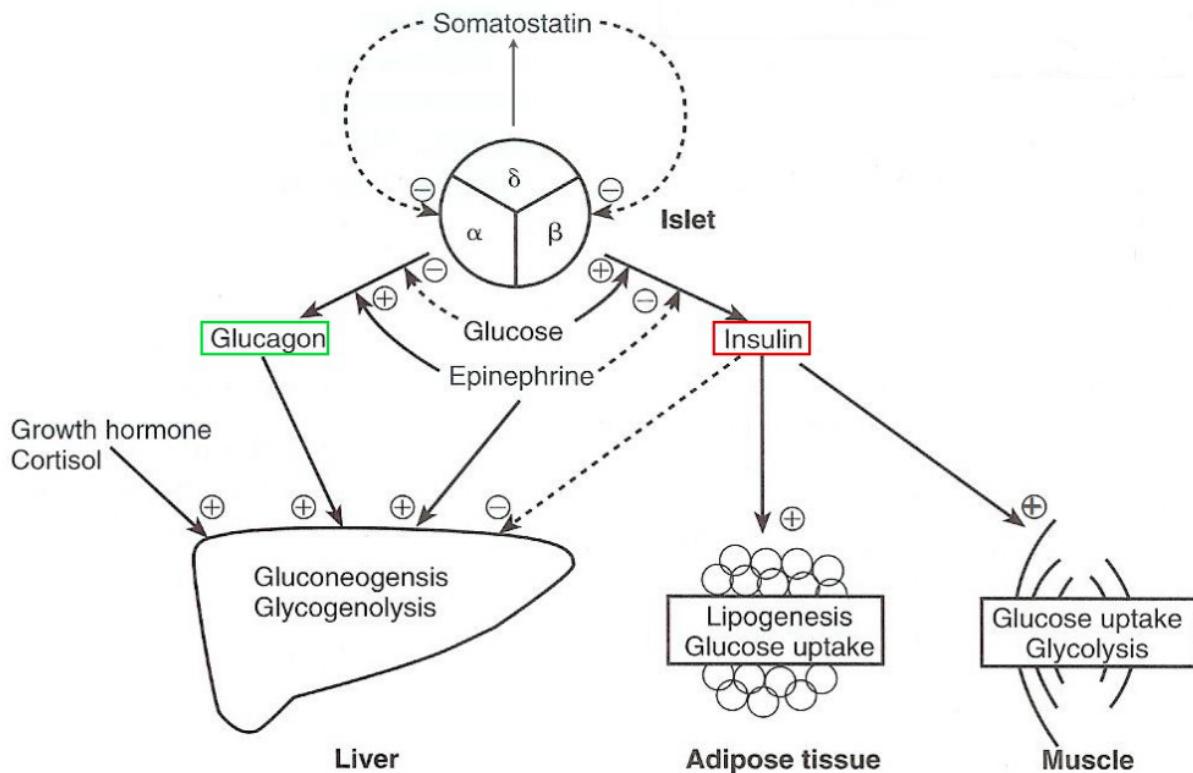


FIGURA 13: Mecanismes hormonals de regulació de la homeòstasi de glucosa

8.2 Hiperglucèmies

Hi ha 4 tipus d'hiperglucèmia:

- **Diabetis tipus 1:** Hiperglucèmia de manera abrupta. Els pacients necessiten insulina per sobreviure.
- **Diabetis tipus 2:** Progressió gradual i la insulina no acostuma a ser necessària pel tractament.
- **Altres tipus específics**
- **Diabetis gestacional:** Es produeix en l'últim terç de la gestació. Normalment acaba després del part però en alguns casos el quadre hiperglucèmic continua.

Hi ha 2 subgrups poblacionals en risc de diabetis:

- Intolerància a la glucosa: 2h després de la ingestió de 75 g de glucosa, els nivells de glucosa es troben entre 140 i 199 mg/dL.
- Disfunció de la glucosa en dejuni: La glucosa es troba entre 100 i 125 mg/dL.

Hi ha un marcador circulant usat per monitoritzar els diabètics que és la hemoglobina A_{1c} . L'hemoglobina incorpora glucosa espontàniament a la seva estructura i són un reflex dels nivells circulants de glucosa. Aquesta hemoglobina té una vida mitja llarga.

Els nous criteris diagnòstics de la diabetis són:

- Símptomes de diabetis més una concentració casual (no en dejuni) de glucosa superior a 200 mg/dL.
- Glucosa en plasma després d'un dejuni mínim de 8 hores superiors a 126 mg/dL.
- Glucèmia superior a 200 mg/dL després de 2 hores del test de tolerància oral de glucosa.
- Nivells HbA_{1c} superiors a 6,5%.

	TIPUS 1	TIPUS 2
Edat habitual	< 30	> 35
Símptomes	Poliúria Polidípsia Polifàgia	Asimptomàtica
Aspecte físic	Consumpció Deshidratació Pèrdua de consciència	Obesitat
Cetoacidosi	Molt freqüent	Absent
Resposta a insulina	Sensible	Resistent
Tractament	Dieta Insulina Altres	Insuficient Essencial (ràpida+lenta) —
Origen	Herència poligènica Factors ambientals	Al·lels MHC-I Virus
		Suficient A vegades Metformina, sulfonilurees
		Múltiples alteracions Dietes grasses, obesitat, edat

TAULA 3: Tipus de diabetis més freqüents

8.2.1 Alteracions metabòliques

Les més importants són:

- Els individus amb qualsevol dels dos tipus de diabetis són incapços de captar eficientment la glucosa de la sang, ja que la insulina provoca el desplaçament dels transportadors de glucosa GLUT4 a la membrana plasmàtica del múscul i del teixit adipós. La glucosa no pot rebaixar els seus nivells.
- La manca de captació d'insulina o la manca d'insulina circulant provoca que les cèl·lules només responguin al glucagó. Fins i tot, en el cas que les cèl·lules β dels illots de Langerhans hagin desaparegut, les cèl·lules β poden proliferar més d'allò normal. Els efectes del glucagó sobre el fetge provoquen, per exemple, un increment

de la GNG (amb consum d'intermediaris del cicle de Krebs) i de la glicogenòlisi, de tal manera que s'allibera més glucosa en sang.

- A nivell muscular, s'estimula la degradació proteica per abastir el fetge de substrats gluconeogènics.
- L'acumulació de glucosa en sang (també afavorida per l'alliberament d'AG, que bloqueja la captació de glucosa), suposa que el ronyó comenci a excretar glucosa en l'orina (glucosúria). Com que es força el ronyó, una situació d'aquest tipus perllongada pot conduir a una insuficiència renal.
- Com que falta glucosa, els AG es converteixen en el combustible principal, fet que porta a un altre canvi metabòlic característic: l'oxidació excessiva però incompleta dels AG al fetge. L'acetil-CoA produït en la β -oxidació no pot ser oxidat completament pel cicle de Krebs, ja que l'elevada proporció [NADH]/[NAD] produïda per la β -oxidació inhibeix el cicle (hi ha 3 passos del cicle que converteixen NAD en NADH).
- L'acumulació d'acetil-CoA, juntament amb l'estímul de la GNG, ocasiona una sobreproducció dels cossos cetònics acetoacetat i β -hidroxibutirat, que no poden ser usats pels teixits al mateix ritme que els sintetitza el fetge.
- A més, l'acetoacetat pot patir una descarboxilació espontània i esdevenir acetona. L'acetona en nivells alts és detectable per l'alè afruitat (és volàtil, de vegades es confon amb l'etanol) i en l'orina.
- La sobreproducció de cossos cetònics (cetosi) es manifesta per un augment de la seva concentració en sang (cetonèmia) i en orina (cetonúria). Com que els cossos cetònics són àcids carboxílics que s'ionitzen alliberant protons, en la diabetis no controlada aquesta producció d'àcids pot sobrepassar la capacitat amortidora del sistema de bicarbonat de la sang i produir una acidosi, denominada cetoacidosi, que és un risc per a la vida de l'individu. Per exemple, pot produir un coma diabètic.

8.2.2 Complicacions

Alteracions de la microvasculatura i la macrovasculatura. Els vasos es malmeten i generen gangrena sobretot als peus.

Hi ha neuropatia. També hi pot haver retinopatia diabètica.

Els ronyons també pateixen un dany. La glucosa és un osmòlit, i com que la concentració és tant alta no es pot reabsorbir a nivell tubular. La glucosa malmet els glomèruls renals. L'epiteli fenestrat presenta càrregues negatives i impedeix el pas de proteïnes. La glucosa alta fa que els glomèruls siguin més permeables i que a la orina hi hagi més proteïnes, majoritàriament albúmina perquè és la proteïna més abundant del plasma i té un pes de 65 kDa, límit de mida per filtrar als glomèruls (60 kDa).

També hi ha més risc de patir aterosclerosi. Sembla que estar relacionada amb un procés de glicosilació de la superfície de les lipoproteïnes.

8.3 Paràmetres clínics

8.3.1 Glucosa

El **mètode de l'orto-toluïdina** consisteix que en medi àcid, la glucosa reacciona amb amides aromàtiques i genera color. Un altre mètode, el de Benedict està basat en la reducció del Cu (usat en tires reactives per la orina).

El mètode de referència és el mètode que han de tenir tots els laboratoris i poder avaluar la qualitat inter-laboratoris. Per la glucosa, és el **mètode basat en la hexoquinasa** i la glucosa-6-P-deshidrogenasa. La reacció genera NADPH, que es pot mesurar a 340 nm.

Hi pot haver diferents fonts de variabilitat pre-metrològica:

- Sang/Sèrum o plasma. Normalment no s'usa sang total, ja que els eritròcits consumeixen glucosa i els valors sortirien més baixos dels reals.
- La concentració arterial és superior a la venosa.
- L'edat, els fàrmacs (corticoides i diürètics) augmenten la glucosa.

S'han de prendre diferents precaucions:

- No ha de ser sang total (eritròcits contenen < [glc])
- Cal ser ràpids per evitar metabolisme eritrocitari
- Desproteinització prèvia per evitar interferències
- Estabilitat 8h a 25°C - 72h a 4°C

8.3.2 Sobrecàrrega oral de glucosa (SOG)

Si surt un valor alt de glucèmia, es repeteix l'analítica. Si torna a sortir hiperglucèmia es practica un test de sobrecàrrega oral de glucosa o test de tolerància oral a la glucosa. Aquest test es realitza en 4 situacions:

1. Diabetis gestacional
2. Intolerància a la glucosa (IGT)
3. Neuropaties, nefropaties o retinopaties. En casos que la glucèmia sigui inferior a 140 mg/dL (7,7 mM).
4. Estudis epidemiològics

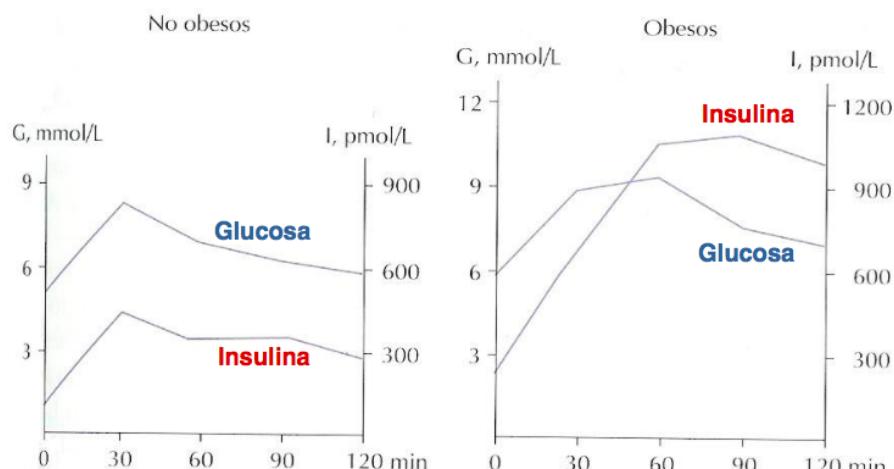
El test consisteix en ingerir 75g de glucosa pels adults i 1,75 g de glucosa/kg en nadons i nens. S'extreu sang a t_0 en dejuni i en situació normal. Cada cert temps es mesura la glucèmia i s'avalua l'evolució de la glucèmia. Els resultats poden ser:

1. Normal: Pic abrupte a 30 minuts fins que a les 2h es normalitza la glucèmia.
2. Diabetis: Fa un pic abrupte a 30 min i després un plateau més o menys estable.
3. Intolerant: Perfil intermedi.

En el cas de la diabetis gestacional, es fa un *screening* cap a les 24 setmanes de gestació. El test de O'Sullivan no requereix que la gestant estigui en dejuni. S'administren 50 g de glucosa i es mesura la glucèmia al cap d'1h. Si surt la glucèmia superior a 7,7 mM es practica un test de SOG però amb 100 g de glucosa i es mira si la glucosa al cap de 2h és inferior a 9,4 mM o bé si hi ha 2 punts de la corba per sobre del llindar.

8.3.3 Insulina

En el SOG, en paral·lel a la glucosa es pot determinar la insulina. No es fa normalment. En situació normal, el perfil d'insulina és paral·lel al de la glucosa.



Peak Insulin Response after Oral Glucose

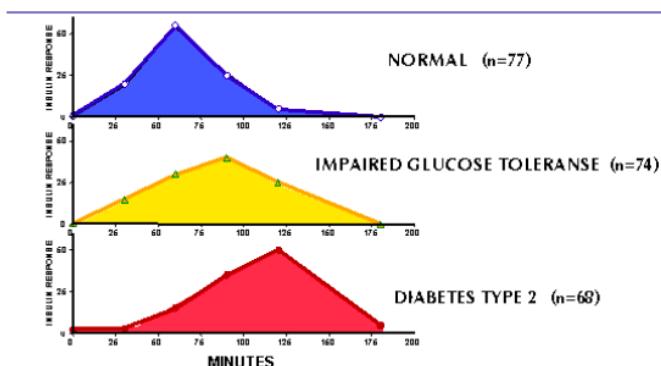


FIGURA 14: Perfil de secreció d'insulina

Hi ha diferents situacions on és interessant determinar la insulina:

-
1. Hipoglucèmia
 2. Insulinoma (tumor que secreta insulina)
 3. Diabètic amb sobredosi

La insulina presenta nivells molt baixos en sang (20 mU/L , $< 118 \text{ pM}$) i es determina per RIA. Durant el SOG, els valors inferiors a 430 pM a $t120$ descarten la resistència a insulina.

El pèptid C és resultat de la proteòlisi de la pro-insulina. La vida mitja del pèptid C circulant és més alta que la de la insulina. Al fetge s'elimina el 75% de la insulina circulant. La relació pèptid C/insulina és equimolar. Normalment, hi ha 5-10 vegades més pèptid C que insulina. Els nivells normals de pèptid C són de $1-2 \text{ ng/mL}$ i es determina per RIA.

1. Si hi ha nivells elevats d'insulina i pèptid C, és síntoma d'insulinoma.
2. Si hi ha més insulina que pèptid C, vol dir que hi hagut una intoxicació per insulina.

8.3.4 Glicohemoglobines

La glicohemoglobina és una glicosilació no enzimàtica de residus Val a la cadena β de l'hemoglobina (disminueixen les càrregues +). La vida mitjana de la hemoglobina és de 120 dies, pel que les glicohemoglobines són un bon indicador de la presència de diabetis.

La HbA representa el 97% de l'hemoglobina circulant, del qual el 6-7% és HbA1. L'HbA1 es pot glicosilar de la manera següent:

- 97% HbA1c (glucosa)
 - HbA1a (fructo-a-1,6-difosfat)
 - HbA1b (altres glúcids sense fosfat)
 - HbA1d (glucopiranòsids)
- 3%

Hi ha una correlació bastant bona entre els nivells de glucosa en sang i els de glicohemoglobina.

La determinació es pot dur a terme mitjançant diferents mètodes:

- Química: hidròlisi àcids, reacció amb àcid tiobarbitúric (color)
- Immunologia: Anticossos contra HbA1c
- Paràmetres físics
 - Electroforesi: Les HbA1 migren més

-
- Isoelectroenfoc: La glicosilació modifica la càrrega de la hemoglobina
 - Cromatografia de bescanvi iònic
 - Cromatografia d'afinitat amb àcid fenilborònic: Es quantifiquen els pics a diferents volums de l'elució.

8.3.5 Fructosamines

Les fructosamines es refereixen a compostos que resulten de la glicació entre un monosacàrid i una amina primària, en aquest cas proteïnes plasmàtiques. Com que la proteïna plasmàtica més abundant és l'albúmina, els nivells de fructosamina reflecteixen els nivells d'albúmina glicada. Com que la vida mitjana de l'albúmina és de 3 setmanes, els nivells de fructosamines al plasma reflecteixen canvis en la glucosa sanguínia relativament recents.

El test es practica:

- Diabètics amb variacions de glucosa
- Embarassades diabètiques
- Confirmació de glicohemoglobina

La determinació es duu a terme mitjançant un mètode colorimètric que empra blau de nitrotetrazoli, que passa a formazona.

8.3.6 Microalbuminúria

La microalbuminúria és un indicador de dany renal quan hi ha una glucèmia alta. Els nivells normals són:

- Normal: 10 mg Albúmina en orina de 24h
- Diabètic: 20-200 mg Albúmina en orina de 24h

La determinació es pot fer per radioimmunoanàlisi, immunoturbidimetria (anticossos units a sefarosa) i amb tires reactives.

8.3.7 Cossos cetònics

La sobreproducció de cossos cetònics (cetosi) es manifesta per un augment de la seva concentració en sang (cetonèmia) i en orina (cetonúria). Com que els cossos cetònics són àcids carboxílics que s'ionitzen alliberant protons, en la diabetis no controlada aquesta producció d'àcids pot sobrepassar la capacitat amortidora del sistema de bicarbonat de la sang i produir una acidosi, denominada cetoacidosi, que és un risc per a la vida de l'individu. Per exemple, pot produir un coma diabètic.

En condicions normals hi ha un 58% de β -hidroxibutirat, un 40% d'acetoacetat i un 2% d'acetona. En el cas de cetoacidosi diabètica, la relació β -hidroxibutirat/acetoacetat és superior a 6.

La determinació es fa normalment mesurant acetoacetat en orina, amb una espectrofotometria després d'una reacció química o enzimàtica.

- Acetest: tabletes de Gly, nitroprussiat de Na, Pi i lactosa. Pren una coloració lavanda-porpra en presència d'acetona i acetoacetat (més sensible per l'acetoacetat, però). Té un codi d'intensitat. Pot tenir interferències amb fenilctones, conservants i L-DOPA.
- Ketostix: Tires reactives basades en el test anterior.
- Test de Gerhardt: Es veu una coloració burdeus de l'acetoacetat en presència de sals de Fe (III). Pot tenir interferències amb salicilats, antipirina, fàrmacs... La comprovació consisteix en escalfar l'orina (l'acetoacetat passa a acetona i s'evapora) i es procedeix a la repetició del test.

8.4 Hipoglucèmies

8.4.1 Fisiològica

En diferents situacions metabòliques com:

- Post-pandrial: 1-3 hores després d'un àpat
- Post-absortiva: 6-10 hores després de l'últim àpat. Sol ser nocturna.
- Cetòtica

8.4.2 Patològiques

N'hi ha de diferents tipus:

- **Congènita:** Cursa amb coma i alteracions neurològiques.
- **Eritroblastosi:** Hiperplàsia pancreàtica
- **Glicogenosi:** Es poden dividir segons el teixit afectat
 - Hepàtic: La síndrome de Von Gierke o la glicogenosi de tipus I està causat per una deficiència de glucosa-6-fosfatasa (GNG i glicogenòlisi). En dejuni, el fetge no pot corregir la hipoglucèmia.
 - Muscular o miopàtic: Deficiència en glicogen fosforilasa muscular. És la malaltia de McArdle o de tipus V. Es manifesta quan es fa exercici físic.

-
- Generalitzada: La malaltia de Pompe és una glicosidasa lisosomal. Els individus no mobilitzen bé el glicogen en molts teixits.
 - La glicogenosi de tipus III o de Cori-Forbes és l'enzim desramificador. L'enzim desramificador produeix glucosa lliure. Té un fenotip lleu.
- **Alteracions del metabolisme de la fructosa:** Fructosúria essencial. Provocada per un dèficit de fructoquinasa al fetge. La fructosa es pot fosforilar per hexoquinasa, a molt baixa velocitat.
- La intolerància hereditària a la fructosa està provocada per una deficiència en aldolasa B (hidrolitza fructosa-1-fosfat). S'ha d'evitar la fructosa a la dieta. Generen hipoglucèmia, hepatomegàlia, icterícia.
- El dèficit en fructosa-1,6-difosfat provoca una deficiència de GNG hepàtica i hipoglucèmia.
- **Alteracions del metabolisme de la galactosa:** S'ha d'evitar la ingestà de lactosa. Galactosèmia. Els malalts desenvolupen cataractes degut a l'acumulació de galactitol al cristal·lí.
- També poden ser deguts a xenobiòtics (fàrmacs), alcoholisme, insulinoma o hipoglucèmia reactiva (hipereficiència del pàncrees).

8.5 Intoleràncies

La més prevalent és la intolerància a la lactosa degut a la deficiència de lactasa intestinal. L'expressió adulta de la lactasa depèn de la dieta.

9. Disfuncions del metabolisme lipídic

9.1 Conceptes generals

9.1.1 Tipus de lipoproteïnes, composició i estructura

Les lipoproteïnes són heteroproteïnes que estan formades per apoproteïnes i lípids. Presenten fosfolípids i colesterol lliure en la seva superfície hidròfila, en contacte amb el medi aquós. La seva composició proteica és variable segons el tipus de lipoproteïna. En el nucli poden transportar qualsevol tipus de lípids i depenent del tipus de lipoproteïna, presentaran una proporció més elevada d'un tipus de lípid respecte un altre tipus.

Nombre	Expresión	Lipoproteínas	AA	Función
ApoA-I	Hígado, intestino delgado	HDL, Qm	243	Estructural, activación LCAT, interacción ABC1 y SRB1
ApoA-II	Hígado	HDL, Qm	146	Estructural, activación LH Ligando de receptores
ApoA-IV	Intestino delgado, hígado	HDL, Qm	377	Activación LCAT, Estimulación LPL
ApoB-100	Hígado	VLDL, IDL, LDL, Lp(a)	453 6	Estructural, unión receptores de LDL
ApoB-48	Intestino delgado	Qm	2152	Estructural
ApoC-I	Hígado, adrenales, intestino delgado	HDL, Qm, VLDL, IDL	57	Activación LCAT y/o LPL? Inhibición PTEC
ApoC-II	Hígado, intestino delgado	HDL, Qm, VLDL, IDL	79	Activación LCAT y LPL
ApoC-III	Hígado, intestino delgado	HDL, Qm, VLDL, IDL	79	Inhibición LPL
ApoD	Hígado, múltiples tejidos y órganos	HDL	174	Activa PTEC
ApoE	Hígado, múltiples tejidos y órganos	HDL, Qm, VLDL, IDL	299	Unión receptor LRP, receptor de LDL y receptor de VLDL

FIGURA 15: Apoproteïnes principals

ApoB està codificat per 1 gen que expressa 2 transcrits: apoB48 s'expressa a intestí (proteïna curta generada per splicing alternatiu) i apoB100 expressa a fetge. ApoB100 s'uneix al receptor de LDL per la part C-terminal.

Hi ha 5 tipus de lipoproteïnes principals:

- 1 **Quilomicrons:** Són les més grans i els que tenen menor densitat i mobilitat electroforètica. El seu component lipídic representa el 99% de la seva estructura i el seu component proteic, l'1% (apoB-48, apoE i apoC-II). Transporten majoritàriament

TAG, que representen el 89% de la seva composició. També transporten colesterol i èsters de colesterol (5%) i fosfolípids (5%).

- 2 **VLDL:** Són de menor dimensió i tenen major densitat i mobilitat electroforètica respecte els quilomicrons. El seu component lipídic representa el 90% de la seva estructura i el seu component proteic el 10% (apoC-II, apoE i apoB-100). Transporten majoritàriament TAG (50%). També transporten colesterol i èsters de colesterol (20%) i fosfolípids (20%).
- 3 **IDL:** Són VLDL romanents. Transporten colesterol i èsters de colesterol al fetge.
- 4 **LDL:** Són de menor dimensió i tenen major densitat i mobilitat electroforètica respecte els VLDL. El seu component lipídic representa el 80% de la seva estructura i el seu component proteic el 20% (apoB- 100). Transporten majoritàriament colesterol i èsters de colesterol (45%). També transporten TAG (10%) i fosfolípids (25%).
- 5 **HDL:** Són els més petits i els que tenen major densitat i mobilitat electroforètica: El seu component lipídic representa el 55% de la seva estructura i el seu component proteic, el 45% (apoA, apoD i LCAT). Transporten majoritàriament colesterol i èsters de colesterol (20%). També transporten TAG (5%) i fosfolípids (30%).

Lipoprotein	Density (g/mL)	Composition (wt %)				
		Protein	Phospholipids	Free cholesterol	Cholesteryl esters	Triacylglycerols
Chylomicrons	<1.006	2	9	1	3	85
VLDL	0.95–1.006	10	18	7	12	50
LDL	1.006–1.063	23	20	8	37	10
HDL	1.063–1.210	55	24	2	15	4

FIGURA 16: Principals tipus de lipoproteïnes plasmàtiques

RECEPTOR	LLIGAND	RECONEXI
LDLR	LDL, QMr, IDL	apoB100/apoE
LRP	QMr/IDL	apoE/LPL, LH
VLDLR	VLDL/IDL	apoE
HDLR	HDL	apoA-I
Scavenger	LDL-ox	

TAULA 4: Receptors de lipoproteïnes

9.1.2 Metabolisme de les lipoproteïnes

Els enzims relacionats amb el metabolisme de les lipoproteïnes són:

- **Enzims lipolítics:**
 - Lipoprotein Lipase (LPL)

-
- Hepatic triglyceride lipase (HTGL/LH)
 - **Enzims de transferència de lípids:**
 - Lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT)
 - Acyl-CoA: cholesterol acyl transferase (ACAT)
 - Cholesteryl ester transfer protein (CEPT)
 - Phospholipid transfer protein (PLTP)
 - Microsomal TAG transfer protein (MTP)

9.1.2.1 Via exògena

Els QM són sintetitzats al REL dels enteròcits i traslladats posteriorment a la circulació sanguínia a través del sistema limfàtic, que desemboca a la vena subclàvia esquerra. La seva maduració es produeix en el torrent sanguini gràcies a l'HDL. La seva funció principal és transportar els TAG dietaris al teixit adipós, teixit muscular cardíac i esquelètic (combustible) i teixit mamari (en etapa de lactància); però bona part dels triglicèrids són transportats als adipòcits per ser emmagatzemats en vacúols lipídics.

Els QM poden lliurar la major part dels TAG als altres teixits gràcies a la apoC-II, que reconeix i activa la lipoproteïna lipasa (LPL) que es troba en els capil·lars dels teixits abans esmentats. La LPL (càrrega positiva) es troba al llum del capil·lar penjant de les cèl·lules endotelials d'un sulfat d'heparan (càrrega negativa). Hidrolitza els TAG en 3 A.G i glicerol. Els NEFA seran transportats a l'interior de les cèl·lules del teixit corresponent a través de l'albúmina.

Els QM residuals o romanents (que encara contenen colesterol, apoE, apoB-48 i pocs TAG) es mobilitzen a través del torrent sanguini fins al fetge. Receptors hepàtics (LRP) s'uneixen a apoE i faciliten la seva captació per endocitosi (endocitosi facilitada per receptor).

9.1.2.2 Via endògena

Els VLDL són sintetitzats en el REL dels hepatòcits, procés que succeeix quan la dieta conté més àcids grassos dels que són necessaris o hi ha excés de glúcids, que permeten la formació de TAG, que s'empaqueten amb apoproteïnes específiques formant les VLDL. Contenen apoB-100, les 3 apoC, apoE, colesterol i èsters de colesterol.

Els VLDL transporten majoritàriament TAG lliurant els seus àcids grassos al múscul (esquelètic i cardíac), on són consumits com a combustible i al teixit adipós, on es reconverteixen en TAG i s'emmagatzemen. El mecanisme de lliurament és el mateix que el dels quilomicrons (apoC-II i LPL).

La pèrdua dels TAG converteix part de les VLDL en VLDL residuals (IDL) i en LDL. Les IDL són captats per receptors hepàtics (LRP) que s'uneixen a apoE, facilitant l'endocitosi (endocitosi facilitada per receptor).

Els LDL són formats a partir dels VLDL. Són molt riques en colesterol i èsters de colesterol i només contenen apoB-100. Transporten el colesterol a teixits extrahepatòtics, però també part de les LDL torna al fetge.

Cada partícula de LDL conté apoB-100, que és reconeguda pels receptors de LDL (glucoproteïnes integrals de membrana) que es troben en les cèl·lules que necessiten captar colesterol. La unió del LDL al seu receptor inicia l'endocitosi, que porta la LDL i el seu receptor associat a l'interior de la cèl·lula en un endosoma.

L'endosoma es fusiona amb un lisosoma, que conté enzims que hidrolitzen els èsters de colesterol i l'apoB-100, alliberant àcids grassos, colesterol i aminoàcids al citosol. El receptor de LDL no es degradada i torna a la superfície de la membrana. Quan la cèl·lula té suficient colesterol, s'atura la síntesi del receptor de LDL. L'apoB-100 també està present en VLDL, però el seu domini d'unió al receptor de LDL no és accessible fins que es converteix en LDL, que l'exposa.

El colesterol que entra a les cèl·lules per aquesta via pot incorporar-se a les membranes o ser re-esterificat per l'ACAT (acil-CoA-colesterol acil transferasa) per ser emmagatzemat en petites vacúols lipídics.

Els HDL, quan són madurs, participen en el metabolisme de les altres lipoproteïnes ja que interaccionen amb elles cedint o agafant apoproteïnes, modificant-les. També cedeixen èsters de colesterol i a vegades agafen TAG. Contenen apoA-I, apoA-II, apoD i LCAT (també contenen apoE i apoC-II, que seran transferides a QM i VLDL). La síntesi pot ser tant al fetge com a l'intestí.

Els HDL madurs, a través de la PTEC (proteïna de transferència d'èsters de colesterol) cedeixen apoE i apoC-II als quilomicrons i VLDL naixents, madurant-los i capten d'ells, TAG (tot a favor de gradient). També cedeixen èsters de colesterol a les LDL, VLDL i QM.

9.1.2.3 Transport revers de colesterol

La síntesi de les HDL comença al fetge o a l'intestí, on es produeix l'acoblament de les apoproteïnes, la LCAT, fosfolípids i colesterol, formant el precursor de HDL (forma discoidal). L'HDL immadur interacciona amb la membrana de teixits extrahepatòtics, enriquint-se en colesterol. Aquesta captació pot ser passiva (interacció apoA-I amb receptor SR-BI de cèl·lules riques en colesterol, moviment passiu del colesterol cap a l'HDL) o facilitada per la interacció d'apoA-I amb els receptors ABCA1 d'una cèl·lula rica en colesterol. A continuació, la LCAT esterifica el colesterol en èsters de colesterol, provocant la maduració de l'HDL (forma esfèrica). L'HDL madur interactuarà amb les altres lipoproteïnes i finalment, descarregarà el colesterol als hepatòcits, que també tenen receptors SR-B1 (les glàndules adrenals també en tenen), que seran reconegudes per l'apoA-I.

9.2 Paràmetres analítics

9.2.1 Aterosclerosi

L'arteriosclerosi és un procés patològic habitualment anomenat enduriment de les artèries, normalment degut a l'enveliment, enduriment i degeneració de les parets de les artèries esdevingut amb els anys, tot i que també pot afectar persones relativament joves, degut a algunes malalties i a alteracions que afecten els teixits de la part interna de la paret arterial.

L'aterosclerosi és un procés patològic que es caracteritza per l'acumulació d'una substància cèria (fonsamentalment colesterol esterificat) que es denomina placa d'ateroma als vasos sanguinis. Aquesta provoca alteracions cel·lulars patològiques. El colesterol s'acumula quan la suma del colesterol sintetitzat i l'obtingut per la dieta supera els requeriments per la síntesi d'esteroïdes, sals biliars i membranes.

La placa d'ateroma està formada per colesterol, productes de rebuig, cèl·lules, calci i fibrina. La paret de l'artèria s'engrosseix i perd la seva elasticitat, podent arribar a obstruir l'artèria totalment.

L'aterosclerosi està lligada a nivells elevats de colesterol en sang, i especialment als nivells elevats de colesterol associats a LDLs. Existeix una correlació elevada aterosclerosi-[LDL].

Les LDL són molt susceptibles a l'alteració, a l'oxidació, i quan resten molt de temps en sang (ja que n'hi ha en excés i no són captades), són més susceptibles d'alterar-se.

La formació de plaques segueix 3 etapes:

- 1) **Etapa primerenca d'inclusió lipídica.** Les LDL que contenen grups acil gras parcialment oxidats s'adhereixen i acumulen a la matriu extracel·lular de les cèl·lules epitelials que recobreixen les artèries. Llavors, els monòcits circulants es diferencien a macròfags i capten les LDL oxidades, així com el colesterol que contenen. El procés de captació és per endocitosi mitjançada per receptor escombriaire (scavenger) SR-A1. Es generen regions amb acumulacions de LDL i macròfags, que no poden limitar la quantitat de LDL oxidada ja que SR-A1 no està regulat negativament per LDL, i amb l'acumulació creixent de colesterol lliure i èsters de colesterol al seu interior fa que esdevinguin cèl·lules espumoses. A mesura que l'excés de colesterol s'acumula a les cèl·lules espumoses i les seves membranes, experimenten apoptosis.
- 2) **Progressió.** Arriba un moment en què l'acumulació de cèl·lules espumoses és excessiu, es malmet la matriu extracel·lular i es desencadena una reordenació cel·lular de les fibres musculars llises, que acaben formant un teixit cicatritzant tot envoltant les acumulacions de cèl·lules espumoses. Durant llargs períodes de temps, els processos inflamatoris i d'embolcallament descrits segueixen transcorrent i les artèries estan cada cop més col·lapsades. Quan el múscul llis ha envoltat l'acumulació cel·lular anòmala, el conjunt rep el nom de placa d'ateroma (que és una placa ateroscleròtica).

3) **Oclusió.** El creixement progressiu de la placa pot acabar provocant el desenvolupament d'un trombe plaquetari, que té el perill de taponar el vas.

De tant en tant, una placa es pot trencar i quedar alliberada del seu lloc de formació, transportant-se a través de la sang fins una regió més estreta d'una artèria cerebral o del cor, fet que dóna lloc a un ictus o un atac de cor.

L'aterosclerosi és una malaltia lenta i progressiva, però de vegades té el potencial de progressar ràpidament. El cor i l'encèfal són els principals perjudicats per la falta d'irrigació, ja que són teixits amb un metabolisme oxidatiu intens, on cal una aportació constant d'oxigen.

Quan l'obstrucció d'una o més artèries coronàries afecta més del 75% de la llum és quan la malaltia comença a donar símptomes. El flux insuficient de la sang cap al múscul cardíac a causa de l'estretament de l'artèria coronària pot causar dolor de pit, l'**angina de pit**.

Quan l'obstrucció és completa o gairebé, es causa un dany irreversible al múscul cardíac. Un **infart de miocardi** té un grau d'affectació (necrosi) determinat per la recuperació del flux de sang a la musculatura esquelètica afectada.

Si hi ha una obstrucció completa o gairebé dels vasos encefàlics, el dany és irreversible i té lloc un **ictus**. Tot depèn del temps que duri la hipòxia al teixit afectat; com més temps, pitjor pronòstic de recuperació i major extensió de necrosi.

9.2.2 Dislipèmia

Es diferencien 2 condicions:

- Dislipèmia: terme general, que caracteritza qualsevol alteració del nivell de lípids en sang (tant increment com descens dels nivells).
- Hiperlipèmies: alteracions patològiques del metabolisme lipídic que duen a un increment de la concentració de lípids a la sang.

En cas d'una dislipèmia (alteració dels nivells de lípids circulants), en primer lloc s'ha de confirmar amb 2 analítiques separades per un interval de 2 setmanes. Es descarten possibles causes secundàries, com:

- Diabetis (glucèmia)
- Hepatopaties (transaminases)
- Hipotiroïdisme (TSH)
- Síndrome nefròtic (proteïnúria)
- Paraproteïnes (electroforesi del plasma)

Si no hi ha causes secundàries, s'ha d'establir el diagnòstic fenotípic i genètic de les diferents dislipèmies primàries.

La separació de les lipoproteïnes es pot fer mitjançant:

- **Centrifugació seqüencial o en gradient de densitat.** La via més ràpida és fer una ultracentrifugació en gradient de densitat de sacarosa. Permet obtenir les fraccions i analitzar-les per separat.
- **Electroforesi:** Dóna una imatge general del perfil de lipoproteïnes. Es fa en agarosa o acetat de cel·lulosa. La mobilitat de les lipoproteïnes ve determinada per la quantitat de proteïna. Les que migren menys són les més grans i amb menys proteïna (QM).

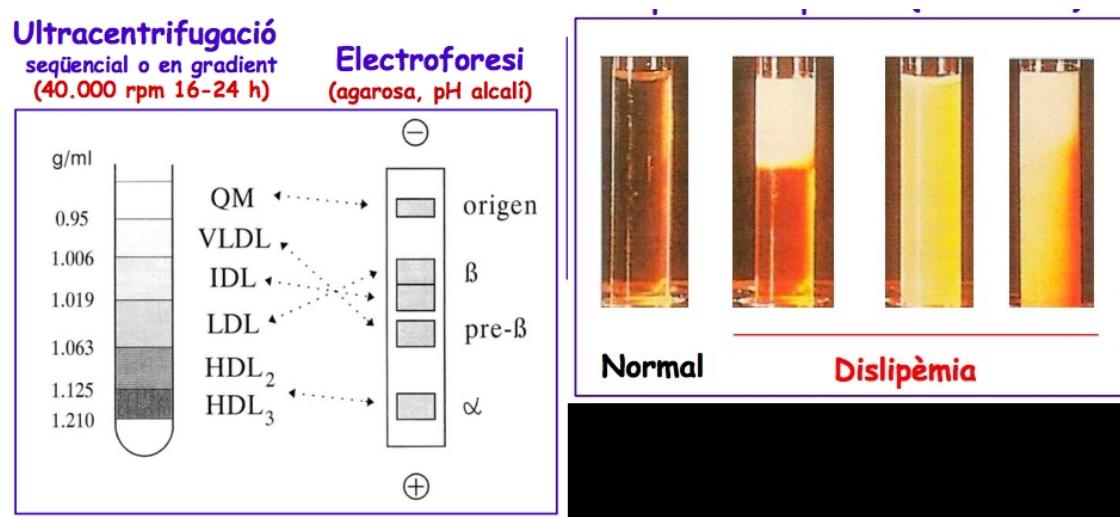


FIGURA 17: Separació de les lipoproteïnes

També es mira l'aspecte del plasma reposat 12h a 4°C:

- 1r tub dislipèmia: Les partícules que suren són poc denses, són QM. Coloració blanquinosa associada a TAG. Hipertriacilgliceridèmia d'origen exogen.
- 2n tub dislipèmia: Tenen TAG lligats a VLDL. Hipertriacilgliceridèmia d'origen endogen.
- 3r tub dislipèmia: Hipertriacilgliceridèmia combinada.

	Quilomicrons	VLDL	LDL	HDL
Mobilitat electroforètica	Origen	Pre-Beta	Beta	Alfa
Origen	Intestí	Fetge	Plasma	Intestí/Fetge
Transport	TAG exògens	Transport TAG	Colesterol (a teixits)	Colesterol (a fetge: revers)
Eliminació	Fetge	T. Perifèrics i fetge Transf. a LDL	Captació cel·lular	Fetge

FIGURA 18: Característiques de les lipoproteïnes

9.2.3 Lipoproteïnes

Al sèrum del pacient s'afegeix PEG, concavalina o dextrà per precipitar les proteïnes que continguin apoA i apoB. Es poden usar anticossos. Després de centrifugar, al sobrenedant queda el colesterol HDL i al pellet les LDL i VLDL.

Normalment, es determina el colesterol HDL i al LDL es calcula amb una fórmula basada en les determinacions anteriors. El mètode de Friedewald no es pot aplicar si hi ha QM presents en sang. Es considera que l'error en determinar el colesterol de VLDL és superior al comès per una relació matemàtica.

$$\text{Colesterol LDL (mM)} = \text{Col.Total} - \text{Col.HDL} - \frac{[\text{TAG}]}{2,2} \quad (10)$$

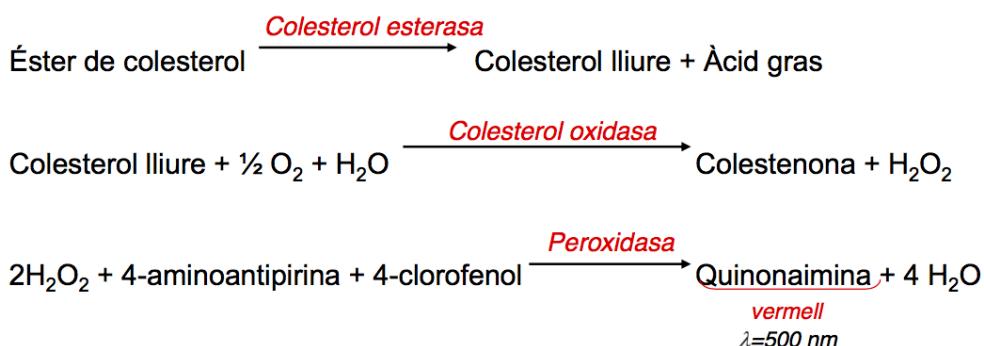
Si s'utilitza mg/dL, la relació VLDL/TAG és 0,2

Per tant, es quantifiquen els TAG en VLDL i es calcula la quantitat de colesterol en VLDL. Friedewald no es pot aplicar quan hi ha QM en plasma i quan es supera el rang normal de TAG (300 mg/dL) o en disbetalipoproteïnèmies.

9.2.4 Colesterol

Informa de la quantitat de colesterol total del plasma. Els valors normals estan al voltant de 200-220 nm. Hi ha diferents mètodes:

- **Mètode de Liebermann-Burchard (químic):** És el mètode de referència. És una reacció del colesterol amb àcid acètic i sulfúric. Es produeix un cromogen degut a la modificació de l'hidroxil i es pot llegir a 620 nm (groc).
- **Mètode enzimàtic (reacció de Trinder):** És el més usat en clínica. Dóna un cromogen vermell a 500 nm. Es reacciona el colesterol amb colesterol esterasa per generar colesterol lliure, colesterol oxidasa que genera peròxid d'hidrogen i finalment amb peroxidasa. La reacció amb peroxidasa és comuna a moltes determinacions.



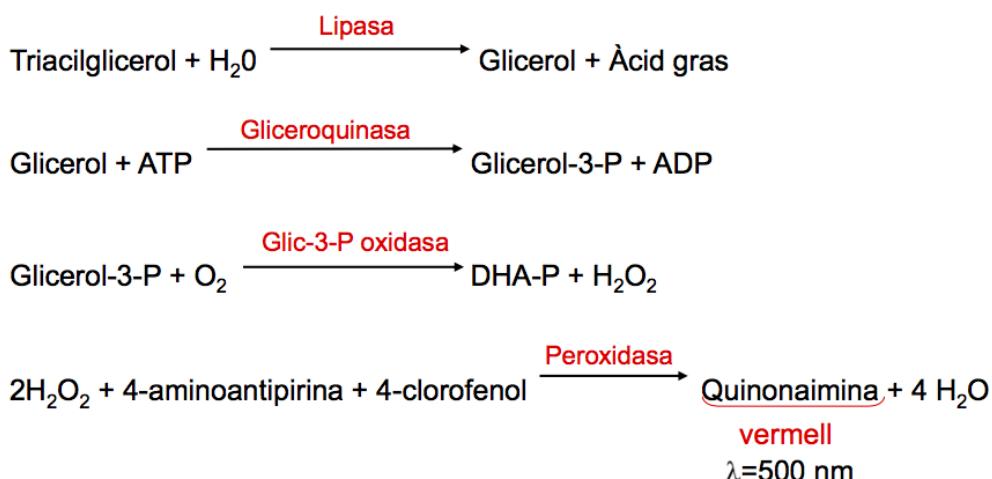
- Química seca

9.2.5 Triacilglicerols

Hi ha 2 mètodes de determinació:

- **Mètode químic:** Extracció de lípids del plasma amb cloroform, saponificació i quantificació del glicerol alliberat (s'oxida fins a formiat amb iodat sòdic i després es fa reaccionar amb àcid cromotrópic (coloració rosa) i lectura a 570 nm).

- **Mètode enzimàtic:**



	Homes		Dones	
	g/L	mM	g/L	mM
Tracilglicèrids	0,45-1,85	0,51-2,09	0,40-1,60	0,45-1,81
(desitjable < 1,7 mM; 150 mg/dL)				
	mg/dL		mg/dL	
Colesterol Total	124-210	3,2-5,4	120-224	3,1-5,7
(desitjable < 5,2 mM; 200 mg/dL)				
VLDL-col	8-17	0,2-0,5	10-16	0,2-0,5
LDL-col	92-143	2,4-3,7	100-149	2,5-3,8
(desitjable < 2,6 mM; 100 mg/dL)				
HDL-col	>35	>0,9	>35	>0,9
(desitjable > 1,0 mM; 40 mg/dL)				

FIGURA 19: Valors de referència

9.3 Dislipèmies

Segons el patró electroforètic i l'aspecte del plasma es poden classificar les diferents hiperlipèmies. La OMS ha establert 5 grans classes d'hiperlipèmies:

- 1 **Típus I. Quilomicronèmia familiar.** Hi ha una banda en origen. Alteracions en TAG d'origen exogen.

2 Tipus II. Hipercolesterolemia:

- a) Tipus IIa: Presenta plasma normal, l'electroforesi mostra una banda beta molt marcada, LDL i colesterol. Risc cardiovascular associat.
- b) Tipus IIb: Plasma blanquinós. TAG augmentats d'origen endogen. Bandes beta i pre-beta (LDL i VLDL). Hipertrigliceridèmia i hipercolesterolemia.

3 Tipus III: Plasma tèrbol i amb un sobredrant blanquinós. L'electroforesi no diferencia la beta i la pre-beta. S'anomena disbetaipoproteïnèmia. Expressió en homozigosi d'un alel de l'apoE (apoE2) tenen predisposició a disbetaipoproteïnèmia, només un 1% dels homozigots generen disbetaipoproteïnèmia. S'acumulen IDL i QMr, això explica la continuïtat de bandes pre beta i beta.

4 Tipus IV: Plasma tèrbol i increment de VLDL.

5 Tipus V: Plasma tèrbol i sobredrant blanquinós. Apareixen molts QM i VLDL.

Les tipus II i IV són bastant comuns en la població.

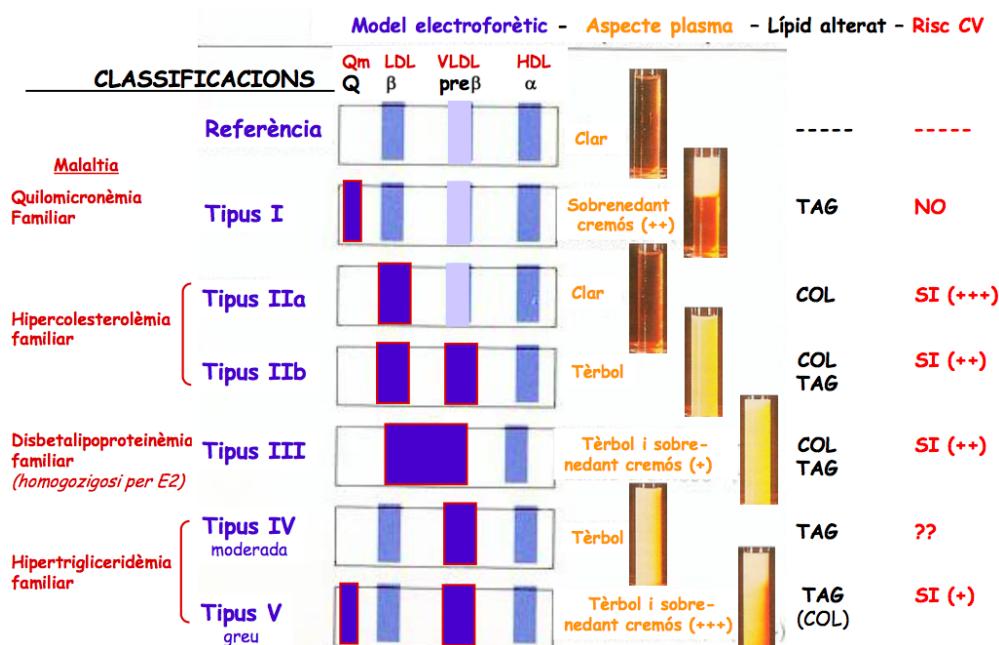


FIGURA 20: Característiques de les dislipèmies

9.3.1 Hiperlipoproteïnèmies primàries

	<u>Causa Dislipèmia</u>	<u>Conseqüència</u>	<u>Risc CV</u>
Quilomicronèmia familiar (Tipus I) Dèficit LPL Dèficit Apo C _{II}	Mutacions gen LPL Mutacions gen Apo C _{II}	↓ Catabolisme Qm ↓ Catabolisme Qm	NO - -
Hipercolesterolemia familiar (Tipus IIa) Monogènica Apo B100 defect. Poligènica	Mutació receptor LDL Mutació gen Apo B Multifactorial	↓ Catabolisme LDL/↑LDL ↓ Catabolisme LDL/↑LDL/RC ↓ Catabolisme LDL	SI +++ +++ +
Hipercolesterolemia familiar (Tipus IIb) Hiperlipoprot. familiar comb.	Aug. síntesi ApoB100	↑ Producció VLDL	SI ++
Disbetaipoproteïnèmia familiar (Tipus III)	Homozigosi ApoE2	↓ Catabolisme IDL	SI ++
Hipertrigliceridèmia familiar (Tipus IV i V) Moderada Greua	Desconeugut Defectes LPL??	↓ Catabolisme VLDL ↓ Catabolisme Qm i VLDL ↑ Síntesi Qm i VLDL	SI ? + +

FIGURA 21: Característiques de les hiperlipoproteïnèmies primàries

- **Quilomicronèmia familiar:** Els nens amb dèficit en LPL no podran processar QM. Es manifesta a la lactància ja que la llet materna té un contingut important en TAG. S'han de donar àcids grassos de cadena mitja i curta (no van per QM) i àcids grassos essencials. El dèficit en apoC2 es tracta amb infusions de plasma ric en apoC2. apoC2 està implicada en el reconeixement de la LPL. Pot ocasionar pancreatitis. No hi ha risc cardiovascular.
- **Hipercolesterolemia familiar:** Mutacions al receptor de LDL o apoB. El receptor de LDL és un gen al qual s'han descrit moltes mutacions. p.Arg3500-Gln3500 és endèmica a Suïssa. També hi pot haver un augment de la síntesi d'apoB100. Es manifesten cutàniament amb xantomes...
- **Disbetaipoproteïnèmia familiar:** 1/10.000 manifesta aquesta dislipèmia. Hi ha factors ambientals que influeixen en la seva manifestació. Està afectada la unió amb LRP, és a dir la retirada de QMr, IDL, beta-VLDL. Les beta-VLDL tenen menys TAG però més contingut en colesterol. Hi ha hipertriglyceridèmia. Es pot mirar la relació $\frac{\text{TAG}}{\text{colesterol}}$, si és 5 els resultats són normals però si és inferior a 3,33 es sospita de disbetaipoproteïnèmia familiar. Presenten xantomes, sobrepès, intolerància a la glucosa.
- **Hipertriglyceridèmia familiar:** No s'associa a un genotip concret. La de tipus IV és molt comú. Es manifesta com a obesitat i intolerància a la glucosa.

El dèficit de LCAT (LCAT esterifica colesterol lliure dels teixits i el carrega a HDL). Es manifesta com un increment de colesterol lliure i aterosclerosi prematura.

Aquests fenotips evolucionen amb el temps.

9.3.2 Hiperlipoproteïnèmies secundàries

Són hiperlipoproteïnèmies provocades per altres malalties.

Malalties	Anomalia lipídica dominant
Diabetes mellitus	Augment TAG (Tipus I, IV i V)
Pancreatitis	Augment TAG (Tipus I i V)
Excès d'alcohol	Augment TAG (Tipus V)
Fallida renal crònica	Augment TAG (Tipus IV i V)
Fàrmacs (diurètics, β -bloquejants,...)	Augment TAG (Tipus IV)
Glicogenosi hepàtica	Augment TAG (Tipus I, III i IV)

FIGURA 22: Característiques de les hiperlipoproteïnèmies secundàries

- La **colèstasi** és una obstrucció de les vies biliars. Hi ha un reflux de bilis cap al fetge i després cap a circulació sistèmica. La bilis a la sang s'associa a lipoproteïnes. Apareixen lipoproteïnes X riques en colesterol, pobres en apo, riques en albúmina, migren cap al càtode. La lipoproteïna X és la bilis empaquetada com a lipoproteïna. També apareix colesterol lliure. La lipoproteïna X està formada per un 90% per lípids i colesterol lliure i la resta és albúmina i apoC i migren cap al càtode (negatiu).
- L'**hipotiroïdisme** es manifesta amb un increment de colesterol circulant ja que el LDLR està regulat per hormones tiroïdals.
- El **síndrome nefròtic** genera un increment de colesterol.
- La **lipoproteïna a** és una lipoproteïna normal que es troba circulant. La composició és molt similar a la LDL. apoB100 presenta un pont disulfur amb una serina proteasa de dominis KRINGLE 4 i 5. Són molt similars als del plasminogen. La lipoproteïna a no té activitat serina proteasa activa però pot competir amb el plasminogen i inhibir la seva funció (deficiència de fibrinòlisi). L'excés de lipoproteïna a provoca problemes a la fibrinòlisi i hipercolesterolemia ja que no és reconeguda pel LDLR. La teràpia és la convencional per hipercolesterolemia.

9.3.3 Hipolipoproteïnèmies

Dins de les **hipolipoproteïnèmies primàries**:

- *HDL afectades:*
 - Analfalipoproteïnèmia (manca de HDL): No es retira colesterol dels teixits ni pas a LDL. Síntesi defectuosa d'apoAI.

-
- Malaltia de Tangier: Hipercolesterolemia amb dipòsits de colesterol als teixits. Defecte a ABCA1, transportador de colesterol cap a fora de les cèl·lules. Les HDL interaccionen amb ABCA1 per recollir el colesterol sobrant. Es va descobrir a l'illa de Tangier degut a l'efecte fundador.
 - *LDL afectades:*
 - Abetalipoproteïnèmia: Mutació en el gen MTP autosòmica recessiva. MTP és el *Microsomal TAG transfer protein*. No es formen QM ni VLDL. Hi ha un dèficit de vitamines liposolubles. Hi ha hipercolesterolemia i absència total d'apoB100 en plasma.
 - Hipobetalipoproteïnèmia: La mutació al gen apoB és autosòmica dominant que genera una forma truncada d'apoB100. La síntesi de LDL està molt afectada, la de VLDL i QM no tant.
 - Malaltia d'Anderson: Malaltia de retenció de QM. Es detecta en nadons ja que la llet materna és rica en lípids. Hi ha un defecte en la sortida de QM a limfa.

Pel que fa a les **hipolipoproteïnèmies secundàries**:

- Hipoalfalipoproteinèmia secundària (lesió hepàtica, fallida renal,...)
- Hipobetalipoproteinèmia secundària (hipertiroïdisme, insuficiència hepàtica,...)

9.3.4 Tractament

Diverses estratègies:

- Estatines: Inhibidor dl'HMG-CoA-reductasa
- Resines segrestadores d'àcids biliars
- Fibrats: Activen la LPL i afavoreixen la oxidació d'àcids grassos al fetge.
- Nicotina: Inhibeix la lipòlisi al teixit adipós i la sortida de TAG al fetge.
- Omega 3: Actuen sobre l'ACAT (esterifica colesterol a les cèl·lules) i activa SREBP permetent la síntesi de nous LDLR.

10. El fetge

10.1 El fetge

10.1.1 Circulació hepàtica

La sang entra el fetge per la via porta (intestí) i a través de l'artèria hepàtica (sistèmica). Surt del fetge a través de la vena hepàtica, que conflueix a la vena cava.

Els nutrients de la dieta arriben via vena porta, arriben als hepatòcits. Al seu torn, els hepatòcits secreten productes als canalicles, que van confluint fins que formen el conducte biliar que va a parar a la vesícula biliar.

10.1.2 Funcions hepàtiques

La zona periportal i la zona perivenosa tenen diferències metabòliques diferents. El fetge secreta albúmina, factors de coagulació...

El fetge té activitat detoxificant d'alcohol, xenobiòtics, toxines...

Hi ha un consens de 5-6 proves que determinen la funció hepàtica. Aquestes proves són:

- Bilirubina plasmàtica: Informadora de la funció detoxificant i excretora.
- Enzims com ALT i AST, fosfatasa alcalina, la γ -glutamil transpeptidasa, LDH. ALT i AST informen de l'estat del parènquima. La fosfatasa alcalina i la γ -glutamil transpeptidasa informen de la ruta biliar. La LDH informa del parènquima.
- Proteïna total plasmàtica
- Albúmina (funció biosintètica a llarg termini). Vida mitjana llarga.
- Temps de protrombina (funció biosintètica a curt termini). Vida mitjana molt curta.

10.2 Estudi de la funció excretora

10.2.1 Producció de bilirubina - Icterícia

La bilirubina és el producte de la degradació dels grups hemo. L'hemoglobina es destrueix al sistema reticuloendotelial. El sistema reticuloendotelial es refereix a les cèl·lules de Kupffer del fetge, macròfags de la melsa, de medul·la òssia, ganglis limfàtics...

El grup hemo consta d'un anell tetrapirròlic que s'ha de linearitzar, ho fa la hemo-oxigenasa que allibera diòxid de carboni i Fe³⁺. S'obté biliverdina, que a través de la biliverdina reductasa es transforma en bilirubina.

Després la bilirubina va al fetge. La bilirubina que es genera és lipofílica. L'acumulació de bilirubina pot causar toxicitat, sobretot al SNC. El fetge aboca la bilirubina a l'intestí, però abans s'ha de fer més hidrosoluble. Al fetge, la UDP-glucuroniltransferasa

introduceix 2 glucoronats a la bilirubina. La UDP-glucuroniltransferasa és un enzim microsomal (RE). Aquest és un procés comú a la via detoxificadora. La bilirubina es transporta per sang lligada a albúmina. S'anomena també bilirubina no esterificada. La bilirubina esterificada és la que ja s'ha conjugat amb glucoronat.

La bilirrubina pot ser:

- Lipofílica, no esterificada, no conjugada, indirecta.
- Hidrosoluble, esterificada, conjugada, directa.

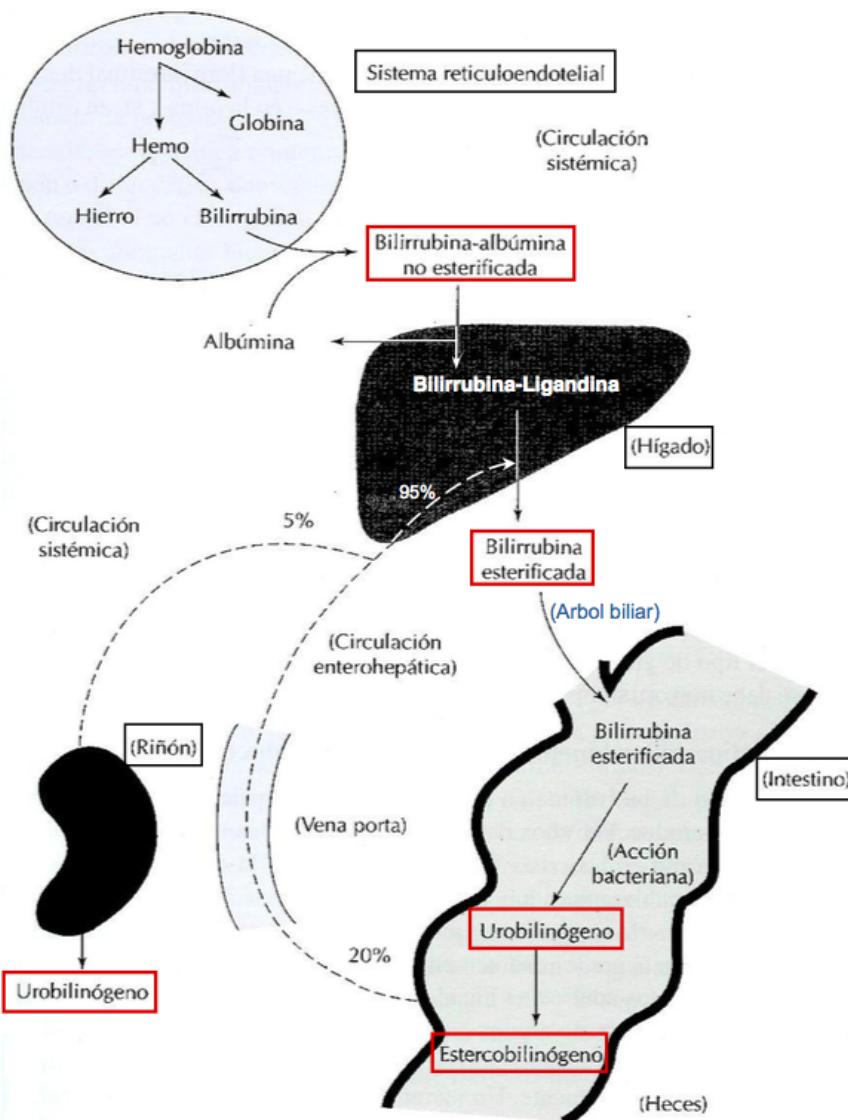


FIGURA 23: Metabolisme de la bilirrubina

Un cop es forma la bilirrubina conjugada, s'aboca a la bilis i després al duodè. La flora microbiana transforma la bilirrubina esterificada en urobilinogen. L'urobilinogen pot tornar a entrar a l'organisme via vena porta. Un 5% va al ronyó i dóna coloració groguenca a la orina.

La bilirrubina entra a l'hepatòcit per un transportador d'albúmina. Pot quedar-se al citosol lligada a ligandina i després anar al RE o directament entrar el RE. La UDP-

glucoroniltransferasa modificarà la bilirubina i serà diglucoronidada. La bilirubina conjugada s'aboca a la membrana canalicular a la bilis.

Aquesta via també s'usa pel reciclatge dels grups hemo dels citocroms hepàtics.

La bilirubina no conjugada es queda a l'organisme i es manifesta com a icterícia. Les analítiques discriminen entre la bilirubina soluble i la resta.

10.2.1.1 Determinació de bilirubina

Es fa per la tècnica de Ehrlich, proposada el 1883. Es tracta la mostra amb àcid sulfanílic diazotizat. Si és bilirubina conjugada, l'àcid atacarà la bilirubina i quedarà lligat a una de les 2 parts de la molècula generades. Per això s'anomena bilirubina directa.

La bilirubina lipòfila és determinada de manera indirecta a partir de la bilirubina total. S'addiciona un dissolvent orgànic a la mostra i després es fa la tècnica d'Ehrlich.

També es pot determinar l'urobilinogen.

10.2.1.2 Icterícia

La icterícia neonatal es deu a que al moment del naixement no hi ha activitat hepàtica completa. Es deu també al recanvi de la Hb fetal per l'adulta. Incrementa la bilirubina liposoluble. La degradació de la bilirubina es pot afavorir per l'exposició a la llum solar. Els nens prematurs se'ls sotmet a rajos UV.

L'acumulació de bilirubina al cervell s'anomena kernicterus i pot causar dany cerebral irreversible.

Una hemòlisi massiva pot causar icterícia ja que el sistema es satura.

Type	Cause	Clinical example	Frequency
Prehepatic	hemolysis	autoimmune abnormal hemoglobin	uncommon depends on region
intrahepatic	infection	hepatitis A, B, C	common/very common
	chemical/drug	acetaminophen alcohol	common common
	genetic errors: bilirubin metabolism	Gilbert's syndrome Crigler–Najjar syndrome Dubin–Johnson syndrome Rotor's syndrome	1 in 20 very rare very rare very rare
	genetic errors: specific proteins	Wilson's disease α_1 antitrypsin	1 in 200 000 1 in 1000 with genotype
Posthepatic	autoimmune	chronic active hepatitis	uncommon/ rare
	neonatal	physiologic	very common
	intrahepatic bile ducts	drugs primary biliary cirrhosis cholangitis	common uncommon common
extrahepatic bile ducts			
		gall stones pancreatic tumor cholangiocarcinoma	very common uncommon rare

FIGURA 24: Causes de la icterícia

-
- Quan hi ha hepatitis es veu que l'entrada a bilirubina i la conjugació no estan afectades però sí que la sortida de bilirubina està alterada. La hepatitis vírica o provocada per fàrmacs induceix una icterícia directa. Es detecta bilirubina en orina de color foscos i les femtes blanques.
 - L'alteració hemolítica només fa canviar la bilirubina indirecta.
 - Síndrome de Gilbert: Problemes amb l'entrada de la bilirubina a l'hepatòcit. A més, la glucoronil transferasa té baixa activitat.
 - Síndrome de Dubin-Johnson i Rotor són icterícies hepàtiques conjugades.
 - La síndrome de Dubin-Johnson s'observa un fetge amb una pigmentació molt fosca (*black liver*). Defecte en el transportador d'anions orgànics de la membrana canalicular.
 - Síndrome de Rotor: Es creu que és un problema de transport de la bilirubina conjugada del RE a la membrana canalicular.

La prova de la BST (bromosulfataleïna) es basa en l'eliminació d'un colorant que passa pel fetge i es pot distingir entre la síndrome de Dubin-Johnson i de Rotor.

10.2.2 Àcids biliars

La bilis està formada per:

- Pigments biliars (bilirubina i biliverdina)
- Àcids biliars sintetitzats a partir de colesterol
- Colesterol lliure
- Fosfolípids
- Ions inorgànics
- Proteïnes

L'eliminació d'hidroxils dels àcids biliars primaris dóna lloc als secundaris, que són produïts a l'intestí per l'acció de la flora bacteriana.

Quan hi ha una obstrucció renal, aquests passen a la circulació sistèmica. Es poden trobar a orina. Els símptomes són una malabsorció de lípids, esteatorrea, femtes clares... Temps de protrombina elevat, icterícia. La obstrucció biliar es comprova administrant vitamina K exògena i mirant si el temps de protrombina es normalitza. El tractament és amb ultrasons, estatinas o l'ablació de la vesícula. Moltes vegades la obstrucció biliar és per cristalls de colesterol ja que hi ha un excés o per déficit d'àcids biliars. Els càlculs biliars es poden tractar amb ultrasons, estatinas o bé amb la resecció quirúrgica de la vesícula biliar.

La determinació d'àcids biliars es fa per tècniques cromatogràfiques (GLC, HPLC), assajos enzimàtics o immunoassaigs.

10.3 Estudi de la capacitat detoxificadora

10.3.1 Eliminació de xenobiòtics

L'eliminació de xenobiòtics o productes tòxics es basa en introduir grups funcionals que facin més solubles aquests productes i facilitar la seva excreció.

- Fase I: Introducció de grups polars: oxidacions, ...
- Fase II: Conjugació amb glucorònic, glicina o taurina.

Les proves que es fan són funcionals:

- **Eliminació de colorants:** Han de ser colorants que no s'eliminin via orina sinó que tinguin pas hepàtic. Rosa de Bengala, bromosulfaleïna. L'aparició d'un pic secundari en la corba d'eliminació plasmàtica del colorant suposa la síndrome de Dubin-Johnson, si el perfil és normal és síndrome de Rotor. En Dubin-Johnson el colorant difon per la membrana i torna a sang.
- **Ús de metil-xantines (cafeïna -> citocrom P450):** Aparició de productes metabòlics en orina. Es valora en sang els productes del metabolisme de metil-xantines exògenes.
- **Metabolisme de fàrmacs (aminopirina-14C):** Velocitat de desaparició del fàrmac a la sang. Aparició de productes metabòlics en sang i/o orina. Anàlisi respiratori ($^{14}\text{CO}_2$).

La via detoxificadora pot produir productes tòxics per l'organisme.

10.4 Estudi de les capacitats biosintètica i metabòlica

10.4.1 Proteïnes

La producció d'albúmina hepàtica és un indicador de la capacitat biosintètica. Es produeixen cada dia 10mg d'albúmina per gram de fetge, que representa el 60% de les proteïnes plasmàtiques. L'albúmina té una vida mitja bastant llarga, pel que la hipoalbuminèmia reflecteix alteracions 2 o 3 setmanes abans de l'estudi.

Molts factors de coagulació també es sintetitzen al fetge:

- Temps de protrombina (TP): FII, FV, FVII, FX i fibrinogen
- Temps de tromboplastina (TPT): precalicreïna, FII, FV, FVIII, FIX, FX, FXII i fibrinogen.

Pre-albúmina	Davallada	Disfunció hepàtica
α_1 -antitripsina	Davallada	Disfunció hepàtica
β_2 -microglobulina	Augment	Cirrosi i hepatitis
Colinesterasa	Davallada	Disfunció hepàtica
α -fetoproteïna	Augment	Carcinoma hepàtic
α_1 -antitripsina	Davallada	Defecte genètic
Ceruloplasmina	Davallada	Malaltia de Wilson
	Augment	Cirrosi, hepatitis vírica.
Transferrina	Davallada	Disfunció hepàtica, alcoholisme, excés de Fe

FIGURA 25: Proteïnes hepàtiques marcadores de patologia

10.4.2 Lípids i lipoproteïnes

Hi ha 2 enzims hepàtics implicats en el metabolisme lipídic implicats en patologia hepàtiques:

- LCAT: Si disminueix LCAT, augmenten els TAG en plasma.
- Lipasa hepàtica: Si disminueix, disminueixen els èsters de colesterol.

En el cas de les lipoproteïnes:

- Hepatitis: Absència de HDL i VLDL, augment de LDL i IDL.
- Hepatitis crònica: Augment de LDL pobres en èsters de colesterol.
- Icterícia obstructiva: Lipoproteïna X

10.4.3 Aminoàcids i nitrogen amíníc

Quan hi ha una davallada del cicle de la urea (glutamina sintetasa) es produeix hipera-monèmia.

La necrosi hepàtica es manifesta amb l'aparició de cristalls de Leu i Tyr en orina.

En una cirrosi o hepatitis apareixen aminoàcids a la orina.

10.4.4 Glúcids

Defectes en el metabolisme de la galactosa provoquen galactossèmia.

La hipoglucèmia es pot produir quan hi ha esteatosi hepàtica (síndrome de Reye per l'administració d'aspirina, alcoholisme).

10.5 Marcadors sèrics

10.5.1 Transaminases

La determinació d'activitat enzimàtica es fa per espectrofotometria a 340 nm.

Indiquen afectació del parènquima hepàtic, si és greu apareix la forma mitocondrial de la GOT.

Quan les transaminases hepàtiques augmenten més de 10x fa sospitar de dany hepàtic.

AST(GOT)	↑↑ Necrosi, Hepatitis, Cirrosi, Icterícia obstructiva, Carcinoma. ↑ Hepatitis alcohòlica
ALT(GPT)	↑ Necrosi Hepàtica, Icterícia obstructiva, Carcinoma, ...
GPT>GOT	Hepatitis viral, Icterícia post-hepàtica, Colestasi
GOT>GPT	Cirrosi, Hepatitis alcohòlica, Carcinoma metastàsic

El criteri de consens:

- **Hepatitis** quan l'increment de transaminases sigui fins a 100 vegades. L'increment de les transaminases serà proporcional al dany hepàtic (ALT > AST).
- **Cirrosi** hi ha molta variabilitat interindividual i AST > ALT.

10.5.2 Fosfatasa alcalina

No és exclusiu de fetge i s'ha de determinar la isoforma que causa l'augment de fosfatasa alcalina. El que es fa és usar inhibidors específics a l'hora de determinar-ne l'activitat o bé fer una electroforesi, ja que la fosfatasa alcalina es glicosila de forma diferencial segons el teixit. La que es retarda en el gel està glicosilada.

La isoforma òssia i hepàtica són les més freqüents en circulació. La isoforma hepàtica està a la membrana canalicular.

Els nens tenen més fosfatasa alcalina en sang (isoforma òssia) degut a la remodelació òssia; que és més intensa en nens que en adults. Per descartar l'alteració hepàtica es determina la 5'-nucleotidasa. Si augmenta en paral·lel la 5'-nucleotidasa, vol dir que hi ha un problema hepàtic.

10.5.3 γ -glutamil transpeptidasa

Marcador de toxicitat hepàtica, sobretot deguda a la ingestió d'alcohol. Es fa servir per monitoritzar alcohòlics crònics i la resposta a determinats fàrmacs.

És una proteïna microsomal dels canalicles biliars i dels conductes periportals, que es troba al plasma a 10-40 UI/L. Hi ha isoformes hepàtiques, renals i pancreàtiques.

10.5.4 5'-nucleotidasa

És un marcador de malalties biliars (modulació paral·lela a la ALP). Té una major especificitat en nens que ALP. Es fa servir en la detecció del carcinoma metastàtic hepàtic

És una proteïna de membrana plasmàtica dels canalicles biliars, que en plasma es troba a 0 - 12 UI/L.

10.6 Alteracions hepàtiques

- **Hepatitis:** Inflamació del fetge per virus, bacteris, paràsits, tòxics... El més habitual és una inflamació aguda molt important que normalment s'acaba curant; a vegades la lesió no es regenera i s'omplen de fibrina generant nòduls hepàtics fibròtics. A vegades, les hepatitis poden ser fulminants. Altres casos, la inflamació es pot cronificar que alterna pics d'inflamació amb estats de repòs; a poc a poc es genera un parènquima ric en nòduls fibròtics.
- **Carcinoma hepatocel·lular**
- **Cirrosi:** Destrucció de l'arquitectura interna de l'òrgan (parènquima nodular i fibrosi).
- **Colèstasi:** Bloqueig de les vies biliars per una infecció, pedra o neoplàsica. Es manifesta amb icterícia, inflamació... La colèstasi és habitual quan hi ha tumors al cap del pàncrees, que obstrueixen la part final de la via biliar.

10.6.1 Hepatitis víriques

Les infeccions víriques al fetge són molt freqüents. Les hepatitis es poden diferenciar per la presència d'anticossos específics en sèrum.

Quan en la hepatitis A es detecten els anticossos, comencen els símptomes. Augmenten la bilirubina i la ALT.

En el cas de l'hepatitis B, es detecten antígens dies abans que comencin els símptomes. L'anticòs de l'antigen de superfície i del nucli es mantenen en sèrum i generen immunitat a llarg termini.

El virus de l'hepatitis D és un virus satèl·lit que replica en una co-infecció.