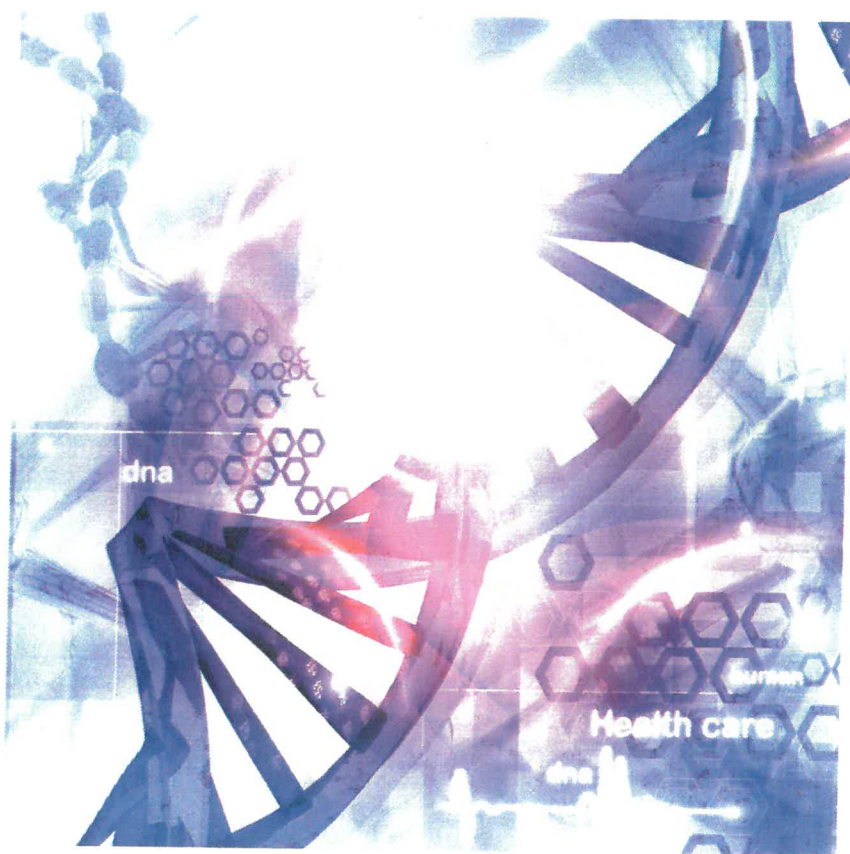


sub redacția Minodora Dobreanu

Biochimie clinică

Implicații practice

Ediția a III-a Vol. 2



2015

Minodora Dobreanu

Biochimie clinică

Implicații practice

Ediția a III-a

Vol. 2



2015

Biochimie clinică: implicații practice. Ediția a III-a (2 volume)
Sub redacția Minodora Dobreanu

ISBN 978-973-169-357-6

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

DOBREANU, MINODORA

Biochimie clinică : implicații practice / Minodora Dobreanu. –

Ed. a 3-a, rev.. - Târgu-Mureș : University Press, 2015

Bibliogr.

Index

ISBN 978-973-169-357-6

577.1:616

Referenți:

Prof. Univ. Dr. Eugen Carasevici, UMF „Gr. T. Popa”, Iași

Prof. Univ. Dr. Marius Sabău, UMF Tîrgu Mureș

Macheta grafică și tehnoredactare computerizată:

Valentin Nădășan

Grafică:

Dr. Zoltán Sárkány

Coperta I: Digital illustration of DNA molecules background.

ID 50166786 © Hywards | Dreamstime.com

Copyright:

Toate drepturile editoriale aparțin în exclusivitate autorilor, publicația fiind protejată integral de legislația internă și internațională. Orice valorificare a conținutului, integral sau parțial (traducere, multiplicare etc.), fără permisiunea scrisă a autorilor, se pedepsește conform legislației în vigoare.

Autorii

în ordine alfabetică:

Claudia Bănescu
Gabriela Bordeianu
Ioana Brudașcă
Simona Cernea
Mircea Cucuianu
Daniela Cristina Dimitriu
Dan Dobreanu
Minodora Dobreanu
Andrea Marta Fodor
Annamaria Földes
Ileana Funduc
Alina Mărginean
Enikő Nemes- Nagy
Elena Petrescu-Dănilă
Ariadna Rădulescu
Alina Scridon
Raluca Stănescu
Didona Ungureanu

Cuprins

Introducere la ediția a III-a	xv
Volumul I	
Capitolul 1. Aspecte moleculare ale vieții. Compoziția chimică și organizarea materiei	1
<i>Minodora Dobreanu</i>	
Capitolul 2. Echilibrul hidro-electrolitic	7
<i>Minodora Dobreanu</i>	
Capitolul 3. Echilibrul acido-bazic al organismului	35
<i>Minodora Dobreanu</i>	
Capitolul 4. Metabolismul calciului, fosforului și magneziului	53
<i>Ioana Brudașcă, Mircea Cucuianu, Minodora Dobreanu</i>	
Capitolul 5. Aminoacizii: structură, clasificare, metabolism	83
<i>Didona Ungureanu</i>	
Capitolul 6. Proteine – structură, funcții și metabolism	119
<i>Minodora Dobreanu</i>	
Capitolul 7. Metode de separare și caracterizare a proteinelor	153
<i>Ileana Funduc</i>	
Capitolul 8. Investigarea biochimică și citologică a lichidului cefalorahidian	187
<i>Ariadna Rădulescu, Ileana Funduc, Minodora Dobreanu</i>	
Capitolul 9. Patochimia funcțiilor renale	203
<i>Minodora Dobreanu, Ileana Funduc, Annamaria Földes</i>	
Capitolul 10. Concepte de bază în interpretarea variațiilor patologice ale enzimelor serice	247
<i>Mircea Cucuianu, Ioana Brudașcă</i>	
Capitolul 11. Biochimia, fiziologia și patologia hemostazei	297
<i>Ioana Brudașcă</i>	
Capitolul 12. Patochimia funcțiilor hepatice	353
<i>Andrea Marta Fodor, Minodora Dobreanu</i>	
Capitolul 13. Hemoproteine și metabolismul fierului. Aspecte fiziologice și patologice	383
<i>Enikő Nemes-Nagy</i>	
Capitolul 14. Biochimia sindroamelor anemice	421
<i>Gabriela Bordeianu, Daniela Cristina Dimitriu</i>	

Volumul II

Capitolul 15. Metabolismul carbohidraților.....	1
<i>Minodora Dobreanu, Simona Cernea</i>	
Capitolul 16. Metabolismul lipidelor/ lipoproteinelor și ateroscleroza	45
<i>Minodora Dobreanu</i>	
Capitolul 17. Biochimia inimii	99
<i>Dan Dobreanu, Alina Scridon</i>	
Capitolul 18. Receptorii celulari și mecanismele de transducție a semnalului.....	129
<i>Alina Scridon</i>	
Capitolul 19. Hormonii hipotalamo-hipofizari – aspecte biochimice și fiziopatologice.....	167
<i>Didona Ungureanu</i>	
Capitolul 20. Hormonii tiroidieni.....	187
<i>Elena Petrescu-Dănilă</i>	
Capitolul 21. Hormonii sexuali - aspecte biochimice, fiziologice, fiziopatologice.....	211
<i>Didona Ungureanu, Raluca Stănescu</i>	
Capitolul 22. Hiperuricemia - Mecanisme de producere și implicații în patologia clinică	229
<i>Mircea Cucuianu, Ioana Brudașcă</i>	
Capitolul 23. Aspecte paraclinice și metabolice în proliferările maligne.....	243
<i>Alina Mărginean, Minodora Dobreanu</i>	
Capitolul 24. Mutațiile genice	303
<i>Claudia Bănescu</i>	
Capitolul 25. Anomalii genetice în cancer. Analize genetice în cancer	321
<i>Claudia Bănescu</i>	
Capitolul 26. Tehnici de diagnostic molecular.....	335
<i>Claudia Bănescu</i>	
Anexa 1. Abrevieri	365
Anexa 2. Valorile normale și limitele de decizie clinică ale testelor de laborator.....	371
Anexa 3. O cronologie a biochimiei.....	377
Anexa 4. Index de subiecte	381

Cuprins volum II

Capitolul 15. Metabolismul carbohidraților.....	1
15.1 Sursele de carbohidrați.....	4
15.2 Utilizarea glucozei de către celulele organismului.....	16
15.3 Mecanismele de reglare ale metabolismului.....	22
15.4 Diabetul zaharat	31
15.5 Prezentări de caz	39
 Capitolul 16. Metabolismul lipidelor/ lipoproteinelor și ateroscleroza	45
16.1 Lipidele	45
16.2 Lipoproteinele	50
16.3 Metabolismul lipidelor / lipoproteinelor	56
16.4 Tulburări ale metabolismului lipidic - Dislipidemiile.....	66
16.5 Factorii de risc aterogen - Ateroscleroza	74
16.6 Considerente privind tratamentul dislipidemiilor	85
16.7 Prezentări de caz	93
 Capitolul 17. Biochimia inimii	99
17.1 Biochimia contracției miocardice	99
17.2 Metabolismul miocardic.....	107
17.3 Ischemia miocardică.....	114
17.4 Biomarkerii în ischemia miocardică.....	120
17.5 Biomarkerii în insuficiența cardiacă.....	124
 Capitolul 18. Receptorii celulari și mecanismele de transducție a semnalului.....	129
18.1 Receptorii celulari.....	130
18.2 Mecanisme semnal independente de receptori – oxidul nitric.....	146
18.3 Mesagerii secunzi	147
18.4 Interacțiunea mecanismelor de transducție a semnalului	162
 Capitolul 19. Hormonii hipotalamo-hipofizari – aspecte biochimice și fiziopatologice	167
19.1 Hormonii hipotalamici.....	167
19.2 Hormonii adenohipofizari.....	169
19.3 Hormonii hipofizei posterioare.....	180

Capitolul 20. Hormonii tiroidieni.....	187
20.1 Sinteza hormonilor tiroidieni.....	187
20.2 Reglarea sintezei și secreției hormonilor tiroidieni	190
20.3 Transportul plasmatic și metabolismul hormonilor tiroidieni	192
20.4 Acțiunile biologice ale hormonilor tiroidieni.....	193
20.5 Mecanismul de acțiune al hormonilor tiroidieni	195
20.6 Tulburări ale funcției tiroidiene	197
20.7 Teste de laborator pentru evaluarea funcției tiroidiene.....	204
20.8 Cazuri clinice.....	208
 Capitolul 21. Hormonii sexuali - aspecte biochimice, fiziologice, fiziopatologice.....	211
21.1 Fiziologia reproductivă feminină	211
21.2 Fiziologia reproductivă masculină	214
21.3 Sinteza hormonilor sexuali	215
21.4 Mecanismul de acțiune al hormonilor sexuali.....	219
21.5 Acțiunile fiziologice ale hormonilor sexuali	221
21.6 Evaluarea funcției testiculare	223
21.7 Disfuncții ale glandelor sexuale	225
 Capitolul 22. Hiperuricemia - Mecanisme de producere și implicații în patologia clinică	229
22.1 Sinteza acidului uric.....	229
22.2 Excreția acidului uric.....	232
22.3 Mecanisme patogenetice în dezvoltarea hiperuricemiei	233
22.4 Efecte nocive ale hiperuricemiei	234
22.5 Efecte benefice ale uricemiei.....	237
22.6 Presupusul rol patogen al hipouricemiei	238
 Capitolul 23. Aspecte paraclinice și metabolice în proliferările maligne.....	243
23.1 Introducere.....	243
23.2 Transformări metabolice în celulele maligne.....	246
23.3 Diagnosticul precoce al proliferărilor maligne.....	247
23.4. Peptide non-hormonale ca și indicatori de malignitate - markeri tumorali.....	250
23.5 Sistemul endocrin difuz	266
23.6 Tumori non-endocrine producătoare de hormoni	270
23.7 Enzime și izoenzime.....	274
23.8 Proteine serice speciale.....	278
23.9 Determinarea markerilor tumorali	282
23.10 Evaluarea clinică	288
23.11 Recomandări pentru utilizarea markerilor tumorali.....	290
23.12 Proteomica. Un nou nivel de înțelegere a malignității	294

Capitolul 24. Mutațiile genice	303
24.1 Introducere.....	303
24.2 Clasificarea mutațiilor.....	304
24.3 Mutațiile genice.....	305
24.5 Polimorfismele genetice	317
 Capitolul 25. Anomalii genetice în cancer. Analize genetice în cancer	321
25.1 Introducere	321
25.2 Metode de detectare a modificărilor genetice în neoplazii.....	327
25.3 Utilizarea markerilor cromozomiali și moleculari în monitorizarea bolii reziduale minime	329
25.4 Analiza polimorfismelor mononucleotidice în cancer	331
 Capitolul 26. Tehnici de diagnostic molecular.....	335
 Anexa 1. Abrevieri	365
Anexa 2. O cronologie a biochimiei.....	371
Anexa 3. Valorile normale și limitele de decizie clinică ale testelor de laborator.....	377
Anexa 4. Index de subiecte	381

Introducere la ediția a III-a

Expansiunea crescândă a tehnologiei de specialitate în laboratorul clinic, care crează o presiune suplimentară asupra personalului, accentuează importanța aspectelor analitice și interpretative în rutina diagnosticului de laborator. Dacă partea analitică presupune identificarea și cuantificarea prin diverse tehnici a componentelor fluidelor și țesuturilor, partea interpretativă examinează rezultatele și le utilizează în screening-ul susceptibilităților la boală, în confirmarea diagnosticului diverselor afecțiuni și / sau monitorizarea evoluției afecțiunilor și a eficienței tratamentelor. Ori performanțele interpretative se bazează pe cunoașterea mecanismelor de boală în contextul sindromului clinic. Așezarea interacțiunilor biochimice pe suportul mecanismelor fiziopatologice și a semnelor clinice, realizează una din cele mai practice asocieri în educația medicală de specialitate.

Intenția acestei a III-a ediții a cărții **Biochimie Clinică – implicații practice**, este de a aduce la zi și consolida informațiile prezentate în edițiile anterioare, prin completarea cu o serie de capitole noi, de interes în pregătirea specialiștilor în medicina de laborator din România.

Considerăm materialul de față o bază solidă pentru cei care doresc să dobândească cunoștințe de biochimie clinică. Lucrarea oferă o paletă complexă de informații actuale în domeniu, cu aportul unor specialiști de renume de la UMF Târgu Mureș, UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca, UMF „Grigore T. Popa” Iași, Institutul Clinic Fundeni, care și-au reunit eforturile sub patronajul Asociației de Medicină de Laborator din România (AMLR), cu scopul de a produce un material de referință pentru instruirea specialiștilor care lucrează în laboratoarele medicale, dar și pentru aceia din alte specialități care resimt nevoia unui text la care să poată face constant apel la nevoie.

Adresăm mulțumirile noastre colegilor care au participat cu experiența lor profesională și comentarii pertinente la îmbunătățirea aspectului și a conținutului materialului.

Comentarii sau sugestii sunt binevenite pe adresa: minodora.dobreanu@umftgm.ro

Minodora Dobreanu
12 aprilie 2015

15

Metabolismul carbohidraților

Minodora Dobreanu, Simona Cernea

Glucidele (hidrații de carbon) sunt polialcoolii monomerici (oze) sau polimerizați (polioze), având și o funcție aldehydică sau cetonică, ceea ce face posibilă formarea unui număr însemnat de derivați substituiți (acetilați, aminați, fosforilați, sulfatați), reduși sau oxidați. Din cauza prezenței atomilor de carbon asimetrici în moleculele lor, glucidele au numeroși izomeri optici, care se deosebesc între ei și în privința activităților lor biologice. Acești izomeri pot fi deosebiți în funcție de sensul de rotire al planului de vibrație al luminii polarizate: spre dreapta (D) dextrogire sau stânga (L) levogire.

În soluții apoase, monozaharidele formează câte o legătură semiacetalică (derivat aldehydic) între gruparea carbonilică (aldehydică sau cetonică) și gruparea hidroxilică (alcoolică) cea mai apropiată. Astfel, pe de o parte apare un nou atom de carbon asimetric în moleculă, care duce la dublarea numărului izomerilor activi optic posibil, iar pe de altă parte se formează o structură heterociclică pentagonală (furanoidă: furanoza) sau hexagonală (piranoidă: piranoza), conținând și un atom de oxigen.

Hidroxilul din gruparea carbonilică semiacetalică (carbonul 1 - C1) este deosebit de reactiv și poate forma ușor legături glucozidice, cu gruparea hidroxilică de la atomul de carbon 4 (C4); astfel se formează dizaharide, iar prin repetarea reacției de glicozilare - a oligo- (tri-, tetra-, penta-, hexa-, heptoze) și polizaharide (polioze: glicogenul, amidonul, celuloza). Monozaharidele (aldozele și cetozele) cele mai importante sunt: trioze - glicerinaldehida și dioxiacetona; pentoze - riboza și ribuloza; hexoze - glucoza, manoza, galactoza și fructoza, precum și heptoze - sedoheptuloza.

Monozaharidele din structura catenelor longitudinale ale poliozelor sunt cuplate între ele prin legături glucidice între C1 și C4, iar cele de la nivelul ramificațiilor, între C1 și C6. Orientarea în spațiu a acestor legături este determinată de izomeria optică manifestată la nivelul carbonilului semiacetalic: α sau β . Dizaharidele mai importante sunt: maltoza (α glucozil-1,4- α glucoza), zaharoza (α glucozil-1,2 - β fructoza) și lactoza (β galactozil-1,4- α glucoza). Polizaharidele vegetale cele mai importante pentru om sunt: amidonul (poli α -1,4 și α -1,6 D-glucoza) și celuloza (poli β -1,4 D-glucoza); cel de origine animală este glicogenul (poli α -1,4 și α -1,6 D-glucoza). Celuloza are o structură longitudinală foarte solidă și rezistentă; în structura amidonului și a glicogenului, lanțurile glucidice cuplate prin legături C1 - C4, sunt

răsucite sub formă de spirale hexagonale, cu un număr variabil de ramificații la nivelul atomilor de carbon C1 - C6. *Figura 15.1* prezintă schema structurală și formula chimică a glicogenului.

Carbohidrații sunt larg răspândiți în lumea vie, îndeplinind importante funcții metabolice, dar și structurale.

Glucidele au un rol energetic important: 1 g glucoză furnizează prin descompunere în organism 4,1 kilocalorii. Rezervele glucidice se acumulează în formă polimerizată: în plante sub formă de amidon (dar și de celuloză), iar în celulele animale sub formă de glicogen. Capacitatea de rezervă energetică a glicogenului în organism, în comparație cu cea a grăsimilor, este totuși limitată, mai ales din cauza hidrofiliei sale (fixează o mare cantitate de apă).

Elemente structurale, sub forma glucozaminoglicanilor (mucopolizaharidelor) alcătuiesc substanța fundamentală a diferitelor țesuturi și organe, în frunte cu țesutul conjunctiv, cartilagos și osos. Ele sunt polimerii hexozaminelor, ai acidului hialuronic, ai sulfaților de condroitină, ai dermatan- și heparan-sulfaților. Sub forma unui mediu microporos ordonat, substanța fundamentală acționează și ca moderatorul schimburilor hidrice și osmotice, între

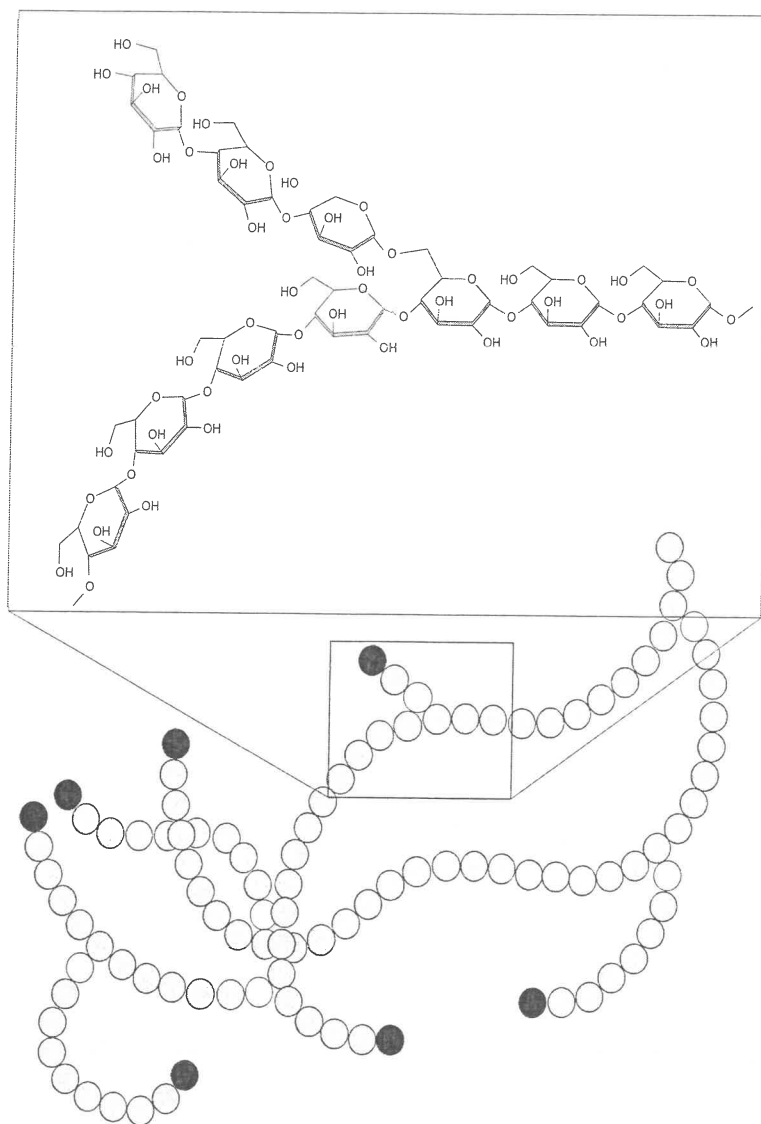


Figura 15.1 Schema structurală a glicogenului și structura chimică a poli α -D-glucozei

lichidele biologice și celule. Distrugerea enzimatică (prin hialuronidază, spreading factor – factor de invazie) a acestei bariere microporoase formate de acidul hialuronic, duce la înlesnirea pătrunderii microbilor, dar și a difuziunii lichidului interstițial. Polizaharidele sunt elemente structurale ale peretelui celular bacterian sau vegetal.

Glicoproteinele conțin lanțuri glucidice fixate de anumiți aminoacizi (ac. aspartic, glutamic, serina și oxiprolina) din structura peptidelor. În cazul glicoproteinelor de tip mucinic, întreaga suprafață a proteinei vehiculante este acoperită de polimeri glucidici. Astfel, acești polimeri funcționează ca lubrifianți în secreții glandulare mucinoase. Glicoproteinele de tip seric conțin catene laterale glucidice cuplate numai la nivelul unor aminoacizi restrânși. Prezența acestor catene laterale, pe de o parte contribuie la determinarea specificității biologice a moleculelor proteinice respective, iar pe de alta parte și la stabilizarea lor, atât pe plan fizico-chimic cât și biologic, prin creșterea rezistenței lor față de proteoliză.

Carbohidrații sunt elemente structurale de bază în diverse molecule biologice active: acizi nucleici, coenzime nucleotidice, glicolipide și furnizori de compuși intermediari, esențiali pentru biosinteza sau interconversiunea unor serii întregi de substanțe și coenzime (NADH, NADPH), pentru metabolismul lipidic (dioxiaceton fostatul, acetatul activat), protidic (piruvatul pentru formarea aminoacizilor neesențiali), nucleoproteinic (riboza, dezoxiriboza) etc. A devenit clar că spre deosebire de concepția anterioară, rolul metabolic complex al glucidelor este mult superior rolului lor energetic.

Glucidele determină specificitatea biologică a moleculelor proteice la care se atașează:

a. Se găsesc în structura antigenelor specifice de grupă sanguină din sistemul ABO (Landsteiner). Acest sistem constă în existența pe suprafața hematiilor, plachetelor, spermatozoizilor, endoteliului și a multor celule epiteliale a unor antigene: AB-H (aglutinogene). În plasmă, respectiv în lichidele biologice, aceste antigene determină apariția unor anticorpi naturali (aglutinine) care aglutinează hematiile la contactul cu antigenul complementar.

Antigenele sunt formate dintr-un suport proteic (sau lipidic) și haptena (determinantul antigenic) alcătuit dintr-un oligozaharid cu patru tipuri de monozaharide: L-fucoza, D-galactoză, N-acetil-galactozamina (NAGal-NH₂) și N-acetil-glucozamina (NAGlu-NH₂).

Biosinteza determinantilor antigenici este controlată genetic prin biosinteza unor enzime (glicozil-transferaze). Structura de bază este alcătuită din Gal-NAGluNH₂-Gal-NAGalNH₂. Gena H codifică α L-fucozil transferaza, care atașează fucoza de structura de bază amintită, formând astfel antigenul specific H (grupa O). La substratul H se atașează NAGal-NH₂ sub acțiunea α NAGalNH₂-transferazei codificate de gena A, formând astfel antigenul specific A. Din substratul H prin adăugarea unui rest de galactoză - sub acțiunea galactoz-transferazei codificată de gena B - se formează antigenul specific B.

Pentru explicarea distribuției grupelor sanguine există două posibilități ipotetice:

1. toți oamenii aparțineau inițial grupei O (specific antigen H) și prin mutații câștigă capacitatea de biosinteză a determinantilor de grupă A și/sau B.
2. toți oamenii posedau inițial determinanți antigenici de grupă A și B, iar printr-o mutație adaptativă pierd capacitatea de biosinteză a uneia sau ambilor determinanți

de grupă sanguină A, B, rămânând grupa 0 (antigen H). În mod speculativ se atribuie epidemiilor de ciumă un rol în geneza acestor mutații.

b. Carbohidrații ajută la formarea determinantilor complexului de histocompatibilitate HLA, a receptorilor hormonal, virali etc.

c. Toate proteinele plasmatice (mai puțin albumina, α amilaza, b-2 microglobulina și proteina C reactivă) sunt glicoproteine: imunoglobulinele, factorii de coagulare, antiproteazele, sistemul complement etc.

15.1 SURSELE DE CARBOHIDRAȚI

Sursele carbohidraților în organismele vii sunt de natură vegetală sau animală: plantele sintetizează carbohidrați prin fotosinteză, folosind energia solară, CO_2 și apă; organismele animale pot sintetiza unii carbohidrați din substraturi relativ simple (de exemplu glicerolul, lactatul, aminoacizii etc).

Glucoza este principala formă sub care sunt absorbiți, utilizați, dar și depozitați carbohidrații în organismele vii.

Glicemia fiziologică la om oscilează în intervalul 70-99 mg/dL, rareori scăzând sub 45 mg/dL sau depășind 140 mg/dL. Acest parametru sanguin depinde de rata de intrare în circulație a glucozei, respectiv de utilizarea acesteia de către celulele consumatoare. Glucoza sanguină poate avea diferite origini:

- a. Din alimentație – în urma proceselor de digestie și absorbție intestinală;
- b. Din depozitul temporar hepatic - prin glicogenoliză/- glicogenogeneză;
- c. Din gluconeogeneza hepatică - din lactoză, alanină, glicerol.

Ficatul este organul central în asigurarea homeostaziei glucozei.

15.1.1 GLUCOZA DE ORIGINE ALIMENTARĂ

Prin alimentația normală ajung zilnic în tubul digestiv aproximativ 350-500 g glucide, sub formă de polizaharide (amidon, glicogen), dizaharide (zaharoză, maltoză, lactoză) și monozaharide (glucoză, fructoză, manoză, pentoze). Deși digestia polizaharidelor începe încă în cavitatea bucală sub acțiunea α amilazei salivare (ptialinei), acțiunea acesteia este neînsemnată (timpul de contact al alimentelor cu saliva este relativ scurt), deoarece în mediul acid al sucului gastric amilaza se inactivează rapid. Digestia poliozelor se desfășoară deci în intestinul subțire (*Figura 15.2*). Alfa amilaza din sucul pancreatic descompune în mediu alcalin legăturile α -glucozidice (- 1, 4 -) din lanțurile longitudinale ale amidonului și glicogenului ingerat, cu eliberarea unor polimeri de hexoze cu grad de polimerizare mai mic (dextrine), iar sub acțiunea dextrinazelor rezultă maltotrioză, maltoză și izomaltoză. Legăturile glucozidice de la nivelul ramificațiilor (- 1, 6 -) sunt hidrolizate de enzima de deramificare (izomaltaza). Oligozaharidele, inclusiv dizaharidele (zaharoza, maltoza), conținând legături glucozidice, sunt descompuse în monozaharide de α -glucozidaze, iar cele cu legături β -glucozidice (lactoză), sunt hidrolizate de β -glucozidaze. La bolnavii cu intoleranță la lactoză această enzimă lipsește din sucul intestinal.

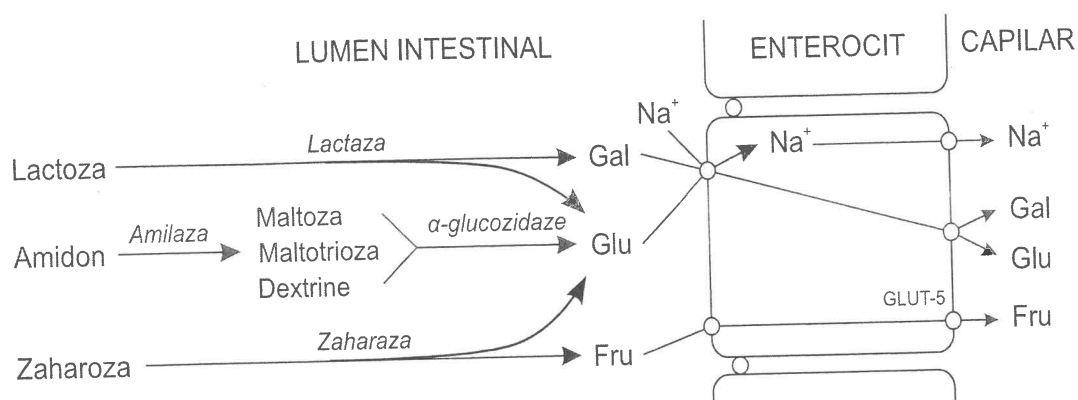


Figura 15.2 Digestia și absorbția glucidelor alimentare

Absorbția intestinală are loc sub forma monozaharidelor α -D glucoză, β -D fructoză și β -D galactoză. Mecanismul absorbției fructozei are loc prin difuziune facilitată (Na^+ -independentă), glucoza și galactoză se absorb activ, prin co-transport Na^+ -monozaharid (simport).

Transportorii monozaharidelor prin membranele celulare sunt proteine membranare denumite GLUT 1 \rightarrow 11, având 500 aminoacizi și 12 segmente transmembranare:

GLUT 1 se găsesc în țesuturile fetale, în membranele hematilor, ale endoteliului barierei hemato-encefalice; deoarece au $K_M \approx 1$ mmol/L, sunt responsabile de preluarea bazală a glucozei (chiar la concentrații plasmatice mici ale glucozei asigură „respirația” celulară, datorită afinității foarte bune pentru glucoză).

GLUT 2 este transportorul specific al glucozei în membrana hepatocitului, celulelor tubulare renale și a celulelor β pancreatice; având $K_M = 15$ -20 mmol/L, funcționează optim doar la concentrații ridicate ale glucozei (postprandial) – au afinitate scăzută pentru glucoză, dar o capacitate de transport foarte mare. Când concentrația glucozei plasmatice este scăzută, aceasta este folosită preferențial de neuroni și alte celule extrahepatice.

GLUT 3 se găsesc în special în placentă și în membranele neuronilor; au $K_M \approx 1$ mmol/L, fiind responsabile de preluarea bazală a glucozei (chiar la concentrații plasmatice mici ale glucozei).

GLUT 4 este transportorul specific în membrana celulelor musculare striate și miocardice, fibroblaștilor și adipocitelor, cu $K_M = 5$ mmol/L; numărul transportorilor activi GLUT 4 este direct influențat de insulină.

GLUT 5 se găsește în membrana bazală (contraluminală) a enterocitelor și lucrează în tandem cu transportorul de fructoză din membrana luminală.

Funcția izoformelor GLUT 6-11 nu este clar definită încă, GLUT 6, 8, 10, 11 par însă mai degrabă implicate în retenția intracelulară a glucozei.

Deversate în vena portă, monozaharidele ajung într-o primă etapă în ficat și străbat membrana hepatocitului. Postprandial, când crește concentrația glucozei sanguine, sunt activi (optim) toți transportorii membranari ai glucozei, inclusiv aceia cu $K_M = 15$ -20 mmol/L, astfel surplusul de glucoză se depozitează sub formă de glicogen în ficat. Interconversiunea manozei în glucoză se realizează în mod spontan, printr-o simplă epimerizare. În schimb, transformarea

galactozei în glucoză se realizează prin intermediul enzimei galactozil-1-P-uridil-transferaza. Lipsa ereditară a acestei enzime duce la acumularea galactozei intrahepatic, dar și în globul ocular și în sistemul nervos central. Transformarea reductivă a acesteia în polialcoolul numit galacticol, cu o toxicitate marcată produce grave leziuni locale. Prin depistarea din timp a anomaliei și prin scoaterea lactozei (a laptelui și a produselor lactate) din alimentația sugarului, poate fi prevenită apariția manifestărilor hepatice, oculare și nervoase grave.

15.1.2 GLICOGENOGENEZA-GLICOGENOLIZA

Glicogenul (Gn) este o formă polimerizată de stocare a glucozei, cu o masă moleculară mare, ușor (rapid) mobilizabilă la nevoie. Structura sa ramificată este similară cu cea a amilopectinei. Ficatul poate depozita glicogen până la 7-10% din masa sa (maximum 150 g), acesta fiind principala sursă pentru menținerea glicemiei în perioadele interprandiale. Mușchiul poate depozita glicogen doar în proporție de 0,7-1,2% din masa sa (în total aproximativ 300-400g), acesta fiind utilizat pe plan local, pentru sinteză de ATP. Glicogenul hepatic prezintă variații circadiene: este maxim după masa de seară și minim înainte de micul dejun: după 14-16 ore de privare alimentară, depozitele hepatice de glicogen se epuizează. În timpul somnului nocturn (de mai lungă durată) sursa menținerii glicemiei virează dinspre glicogenoliză spre gluconeogeneză - proces esențial pentru menținerea glicemiei în perioadele prelungite de înfometare.

15.1.2.1 Aspecte particulare ale metabolismului glicogenului

1. De ce se stochează glucoza în formă polimerizată și nu rămâne în forma simplă?

Glucoza este osmotic activă. O celulă hepatică poate stoca aproximativ 400 mmol/L de glucoză, dar numai în formă polimerizată. Masa moleculară a glicogenului este în jur de 107 D, astfel încât concentrațiile rezultate nu crează probleme osmotice pentru celulă.

2. De ce glicogenul are o structură ramificată?

Este necesar ca glicogenul să fie ramificat (tip "amilopectinic") deoarece în forma aceasta are un singur capăt reducător (-OH glicozidic C_1) și o mulțime de "capete" nereducătoare (-OH neglicozidice C_4) care sunt de fapt locul de acțiune al Gn și Gn sintazei.

Dacă structura glicogenului ar fi de tip "amiloză" (neramificată) cu un singur capăt C_1 și unul C_4 , descompunerea și sinteza glicogenului ar fi foarte lente.

3. De ce nu se stochează excesul energetic determinat de glucoză doar sub forma lipidelor?

Lipidele reprezintă cea mai eficientă modalitate de stocare a energiei în organism, dar au câteva inconveniente din punct de vedere energetic: lipidele nu eliberează energia atât de rapid ca glicogenul, nu pot fi utilizate în anaerobioză și nu pot fi convertite eficient în glucoză, care este combustibilul preferențial pentru unele țesuturi (de exemplu, celula nervoasă și hematia).

În organism, glucoza intră în căi metabolice multiple. În hepatocite și în fibrele musculare (mai modest în alte celule), glucoza activată (transformată în uridil-difosfat-glucoză = UDP-G), se depozitează sub formă de glicogen, printr-o secvență de reacții, numită glicogenogeneză. Glicogen-sintaza formează legături α -glucozidice (-1,4-) între moleculele de glucoză și terminațiile C_4 ale lanțurilor ramificate ale glicogenului. Ramificațiile (-1,6-) se produc sub acțiunea enzimei de ramificare.

15.1.2.2 Glicogenogeneza

Are loc predominant la nivel hepatic sau muscular, imediat postprandial când concentrația glucozei sanguine crește foarte mult. GLUT4 transportă glucoza în miocit, iar GLUT 2 în interiorul hepatocitului, hexokinaza și glucokinaza fosforilează glucoza, menținând-o astfel în interiorul celulei (fosforilarea moleculei de glucoză modifică major solubilitatea acesteia în membranele celulare, în sensul scăderii acesteia):

1. $G + ATP \xrightarrow{HK/GK} G-6-P + ADP;$
2. $G-6-P \xrightarrow{PG\text{-mutaza}} G-1-P;$
3. $G-1-P + UTP \xrightarrow{G-1-P \text{ uridil transferaza}} UDP-G + PPi;$
4. $G_n + UDP-G \xrightarrow{\text{Glicogen sintaza}} G_{n+1} + UDP.$

Glicogen sintaza necesită un primer pentru a-și începe activitatea (glucoza este o moleculă simplă, care nu poate funcționa ca primer). Glicogenina este o proteină care îndeplinește rolul de primer: prin glicozilarea cu UDP-glucoză a unui rest de tirozină, se formează glicogenina glicozilată, care devine un nucleu de sinteză a glicogenului. Când numărul resturilor de glucoză depășește cifra 11, intervine enzima de ramificare, care îndepărtează un lanț de 7 resturi glicozidice, atașându-le printr-o legătură α -1,6 - glicozidică la un alt lanț (sau fragment de lanț), astfel se formează o ramificație.

15.1.2.3 Reglarea glicogenogenezei

Reglarea glicogenogenezei se poate realiza prin trei modalități: modificări covalente, mecanisme alosterice și reglare hormonală. Formele active ale enzimelor glicogenogenezei sunt formele defosforilate.

I. Reglarea covalentă și alosterică

Glicogen sintaza este activă în forma a defosforilată și inactivă în forma b fosforilată (*Figura 15.3*).

Inactivatoarele glicogen sintazei sunt kinaze care catalizează fosforilarea acesteia: protein kinază A - AMPc dependentă, fosforilaz kinaza (AMPc și/sau Ca^{2+} dependentă), proteinkinaze Ca^{2+} dependente (conțin calmodulină), proteinkinaza C (DAG dependentă).

II. Reglarea hormonală – insulina

Creșterea glicemiei duce la eliberarea și creșterea secreției de insulină în celulele β pancreatice; astfel țesuturile dependente de insulină vor fi "atenționate" că există glucoză disponibilă



(Figura 15.4). Pentru efectele de scurtă durată ale insulinei sunt responsabili mesagerii secundari intra-citoplasmatici inozitol fosfoglicanici, care rezultă sub acțiunea stimulatoră a unor substraturi fosforilate ale receptorilor insulinici activați (IRS-1 și -2). Receptorii membranari ai insulinei sunt proteine complexe mari (450 kD) alcătuite din două subunități alfa externe legate prin punți disulfidice (care vin în contact cu insulina) și două lanțuri beta care penetrează membrana celulară. Lanțurile beta (mai exact porțiunile citosolice –COOH terminale) sunt autofosforilante (acțiune autocatalitică) în urma contactului lanțurilor alfa cu insulina; receptorul de insulină fosforilat este o tirozin-kinază, care va fosforila resturi de tirozină din diverse alte proteine intracitoplasmatică, care au la rândul lor activitate kinazică asupra unor resturi de serină și treonină ale unor proteine (altele decât acelea asupra cărora acționează PKA și PKC). Prin intermediul acestora insulina inhibă glicogenoliza hepatică și musculară, stimulează glicogenogeneza, stimulează exprimarea pe membrana miocitului și adipocitului a transportorilor GLUT4. La diabeticii cu rezistență la insulină au fost evidențiate mutații la nivelul subunităților alfa, care alterează transmiterea semnalului reglator spre subunitatea beta; dozele terapeutice de insulină la acești pacienți sunt de 10-100 ori mai mari.

15.1.2.4 Glicogenoliza

Este procesul ce are loc între mesele principale și are drept scop mobilizarea glucozei depozitate în perioadele de abundență energetică (postprandial) în glicogen, cu rolul de a menține glicemia și de a asigura țesuturilor consumatoare substratul energetic.

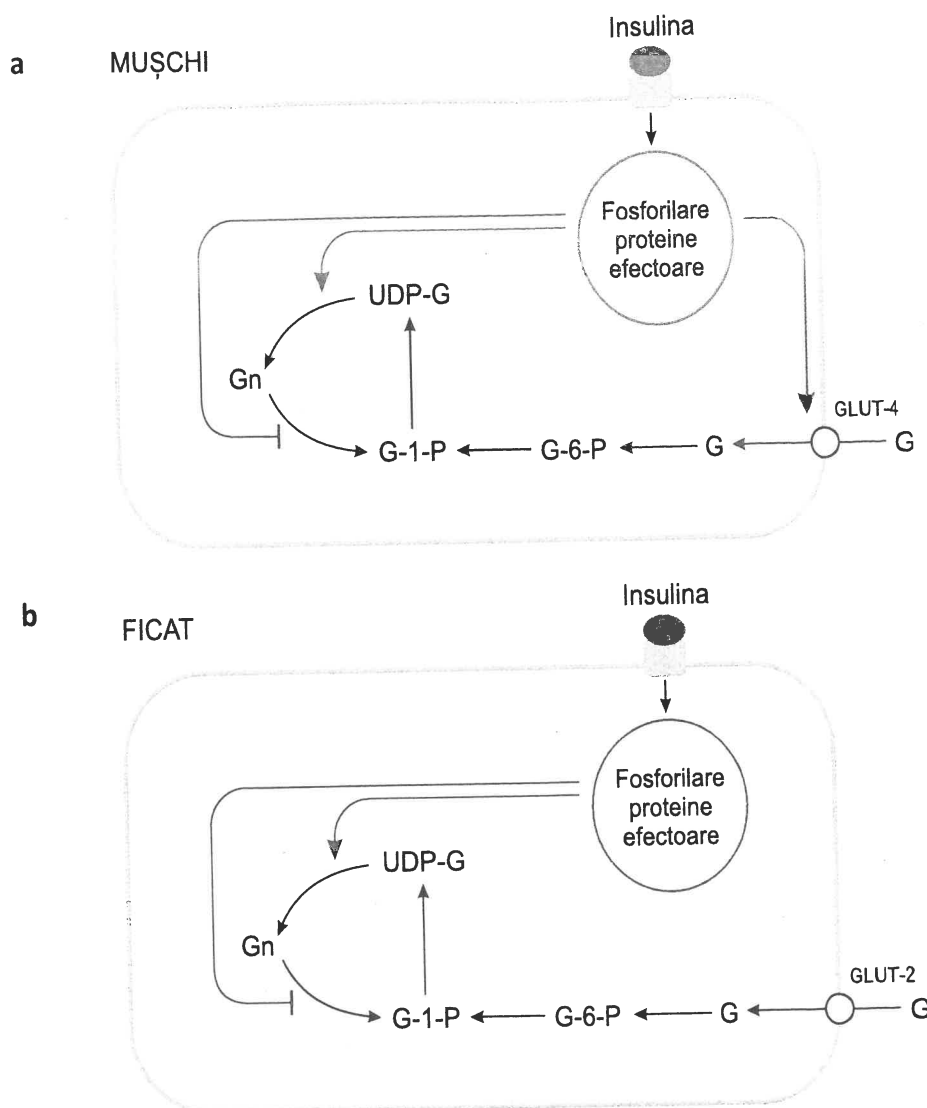


Figura 15.4 Insulina stimulează glicogenogeneza musculară (a) și hepatică (b) și exprimarea transportorilor de glucoză din membrana miocitului - GLUT4

Șirul de reacții care au loc:

1. $\text{Gn} + \text{Pi} \xrightarrow{\text{Fosforilaza}} \text{Gn-1} + \text{G-1-P};$
2. $\text{G-1-P} \xrightarrow{\text{PG-mutaza}} \text{G-6-P};$
3. $\text{G-6-P} \xrightarrow{\text{G-6-P fosfataza}} \text{G} + \text{Pi}.$

Enzima „cheie” a glicogenolizei este fosforilaza, care eliberează succesiv din catenele glicogenului câte o moleculă de glucoză fosforilată (glucoză-1-fosfat). După izomerizarea enzimatică în glucoză-6-fosfat, acest produs poate să urmeze căile metabolice de descompunere anaerobă sau aerobă a glucozei (în mușchi, G-6-P trece direct în calea glicolică și produce ATP), iar pe de altă parte defosforilarea lui de către glucoza-6-fosfat fosfatază, duce la eliberarea glucozei din hepatocite cu GLUT 2 (glucoza nu străbate membrana în formă fosforilată, molecula fiind încărcată electric), cu rol important în menținerea glicemiei.

Glicogen fosforilaza acționează doar asupra legăturilor α 1-4 glicozidice, activitatea ei încetând la distanță de 4 resturi glucidice de legătura 1-6 glicozidică. În această etapă intervine enzima de deramificare cu activitate transferazică (transferă trei resturi de glucoză ale ramificației la capătul catenei principale) și glucozidazică (îndepărtează sub formă de glucoză liberă primul rest al fostei ramificații). Ramificațiile (legăturile-1,6-) catenelor se desfac, după care se continuă descompunerea porțiunilor lineare.

15.1.2.5 Reglarea glicogenolizei

Reglarea glicogenolizei se poate realiza prin trei modalități: modificări covalente, mecanisme alosterice și reglare hormonală. Formele active ale enzimelor glicogenolizei sunt formele fosforilate.

1. Modificări covalente

Glicogen fosforilaza are două forme: una fosforilată (a - activă) și alta nefosforilată (b - inactivă). Fosforilaza este o enzimă dimerică, cu 2 subunități de câte 97.000 D. Un radical de serină din poziția 14 este locul fosforilării.

Fosforilazokinaza este responsabilă pentru fosforilarea (activarea) glicogen fosforilazei (Figura 15.6). Fosforilazokinaza este alcătuită din 16 subunități: α 4, β 4, γ 4, δ 4; α , β și δ sunt subunități reglatoare, iar γ - unitatea catalitică - este calmodulina, care este activată de calciu (activator alosteric).

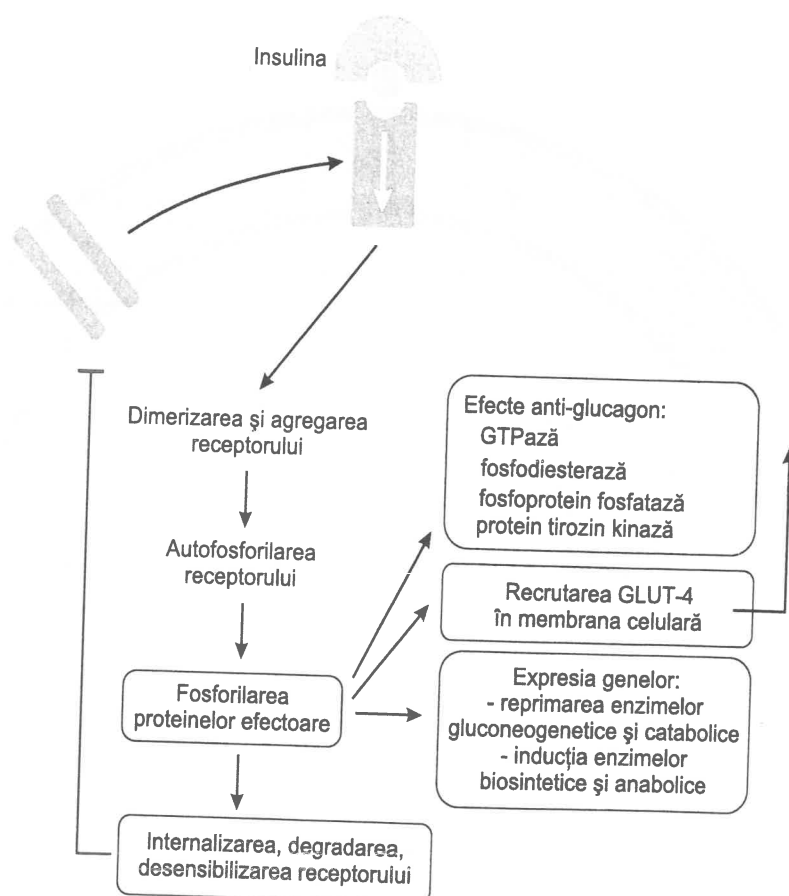


Figura 15.5. Transmiterea intracelulară a "mesajului" insulinei

AMPc și ionii de calciu au efect activator asupra fosforilazokinazei, respectiv glicogen fosforilazei (aducându-le în formele a, fosforilate, active). Glucoza și ATP-ul sunt inhibitori alosterici ai glicogen fosforilazei a. AMPc are efect stimulator asupra fosforilării inhibitorului 1 al fosfatazei (enzimă care transformă glicogen fosforilaza a în glicogen fosforilază b (Figura 15.6).

II. Mecanisme alosterice

Glicogen fosforilaza este supusă activării alosterice prin AMP (care acționează asupra formei b). Inhibiția alosterică este realizată prin ATP și glucoză asupra formei a. De fapt, fosforilaza a hepatică "funcționează" ca un acceptor citoplasmatic pentru glucoză. Fosforilaza musculară este reglată alosteric de cuplul ATP/AMP (care reflectă necesitățile energetice ale mușchiului).

Concentrația AMP-ului crește după activități musculare intense, acesta fiind activator alosteric al glicogen fosforilazei. Concentrația crescută de ATP este un inhibitor alosteric al glicogen fosforilazei.

III. Reglarea hormonală - glucagonul și adrenalina

Glucagonul și adrenalina stimulează glicogenoliza în ficat. Glucagonul are efect hiperglicemiant și prin inhibarea glicogensintazei, 6-fosfofructo-kinazei și a piruvat-kinazei. Glucagonul acționează prin intermediul AMPc, generat din ATP de adenilat ciclază (enzimă activată de proteinele G - subunitatea α - aflate în relație cu receptorul de glucagon) (Figura 15.7a); AMPc activează protein kinaza A – PKA – prin intermediul căreia fosforilează glicogensintaza

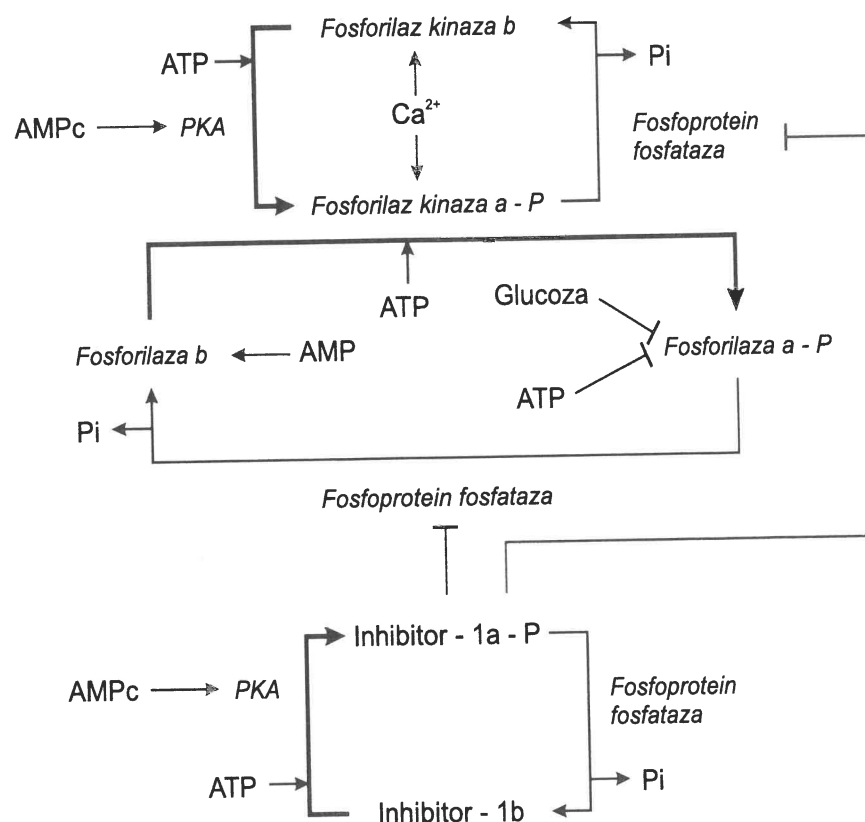


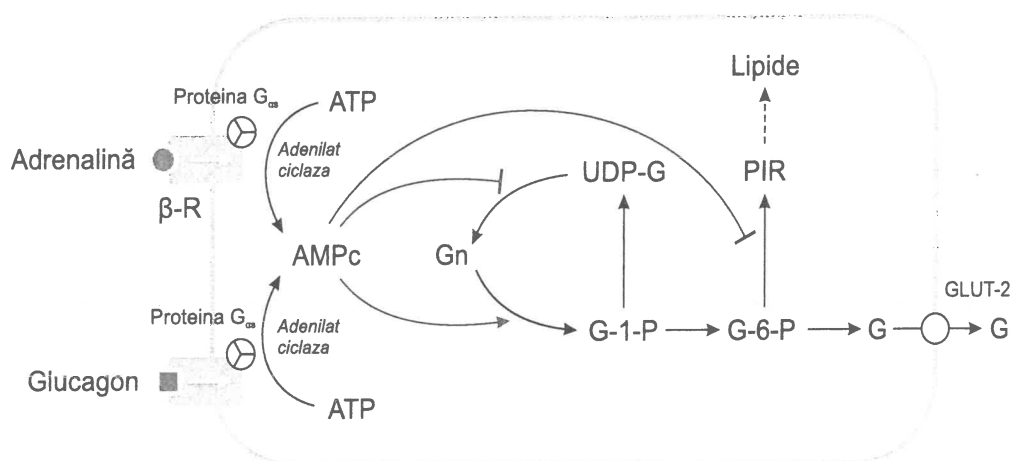
Figura 15.6. Reglarea covalentă și alosterică a fosforilazei

(la forma inactivă b), fosforilaz kinaza (la forma activă a) și inhibitorul-1 (a), care împiedică inactivarea fosforilazei active.

Adrenalina acționează pe trei căi:

1. stimulează eliberarea glucagonului din celulele α pancreatice;
2. prin intermediul β receptorilor hepatocitari, stimulează sinteza AMPc cu efecte similare glucagonului;
3. prin α receptorii hepatocitari cuplați cu fosfolipaza C (enzimă activată de proteinele G -subunitatea α_i), determină activarea fosfolipazei C cu formarea diacilglicerolului (DAG) și inozitoltrifosfatului (IP_3) ca mesageri secundari. DAG activează protein kinaza C – PKC - care determină fosforilarea mai multor enzime citoplasmice (inclusiv a glicogen sintazei și fosforilazei). Apariția IP_3 în citoplasmă conduce la creșterea concentrației calciului (Figura 15.7b). Calmodulina activată de calciu stimulează fosforilaz kinaza și astfel - glicogenoliza.

a FICAT



b FICAT

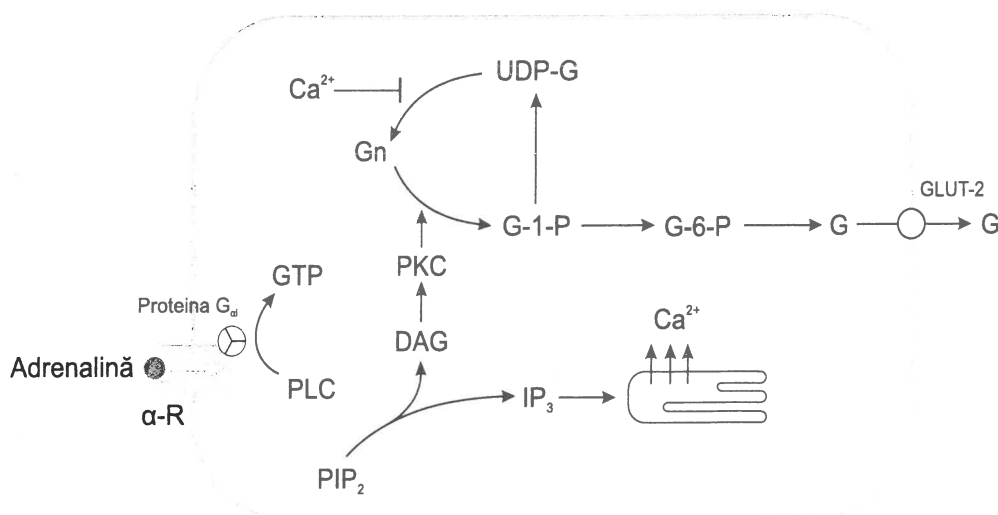


Figura 15.7 Mecanismele de activare a glicogenolizei hepatice prin glucagon și adrenalină –
a. prin intermediul receptorilor beta adrenergici,
b. prin intermediul receptorilor alfa adrenergici

În mușchi, adrenalina favorizează glicogenoliza cuplându-se la β receptori, care prin adenilat ciclază duc la formare de AMPc (Figura 15.8). Glucoza este descompusă până la piruvat, piruvatul este decarboxilat oxidativ, iar în ciclul Krebs cuplat cu lanțul de oxidare biologică, acetil CoA își eliberează energia, descompunându-se în apă și CO_2 . Prin eliberarea de acetilcolină la nivelul plăcii neuromotorii, impulsurile nervoase măresc nivelul calciului intracitosolar, ceea ce stimulează rapid glicogenoliza (chiar în lipsa catecolaminelor), eliberarea glucozei și transformarea ei în piruvat. Creșterea concentrației intracelulare de calciu induce glicogenoliza (Figura 15.8) și paralel contracția musculară. Calciul are un rol important în sincronizarea acestor două procese. Un al treilea mecanism de activare a glicogenolizei musculare este acela produs de activarea fosforilazei de către AMP-ul rezultat în urma descompunerii ATP. Efectele stimulatoare ale ionului de calciu și AMP-ului, asigură răspunsul la nevoile energetice ale musculaturii, chiar în lipsa stimulării hormonale.

15.1.2.6 Deficite ereditare ale metabolismului glicogenului

În cazuri de lipsă ereditară a uneia dintre enzimele cuprinse în glicogenoliză, dar și în unele faze mai incipiente ale metabolismului glucozei, glicogenul se acumulează în hepatocite sau în fibrele musculare, ducând la apariția diferitelor forme ale glicogenozelor, prezentate în Tabelul 15.1. Sunt descrise actualmente cel puțin 14 tipuri de glicogenoze, unele dintre ele fiind variante ale altora (de exemplu tipurile XII, XIII și XIV sunt subtipuri al glicogenozei McArdle).

15.1.3 FORMAREA GLUCOZEI DIN ALTE SUBSTANȚE: GLUCONEOGENEZA

Deși majoritatea organelor și țesuturilor își acoperă necesitățile de glucoză din sângele circulant, în unele organe (ficatul, rinchii), pe baza reversibilității reacțiilor glicolizei, alte substanțe (acidul lactic, glicerolul, aminoacizii glucogenetici) pot fi transformate în glucoză. Există totuși trei etape ireversibile ale descompunerii glucozei, care trebuie ocolite:

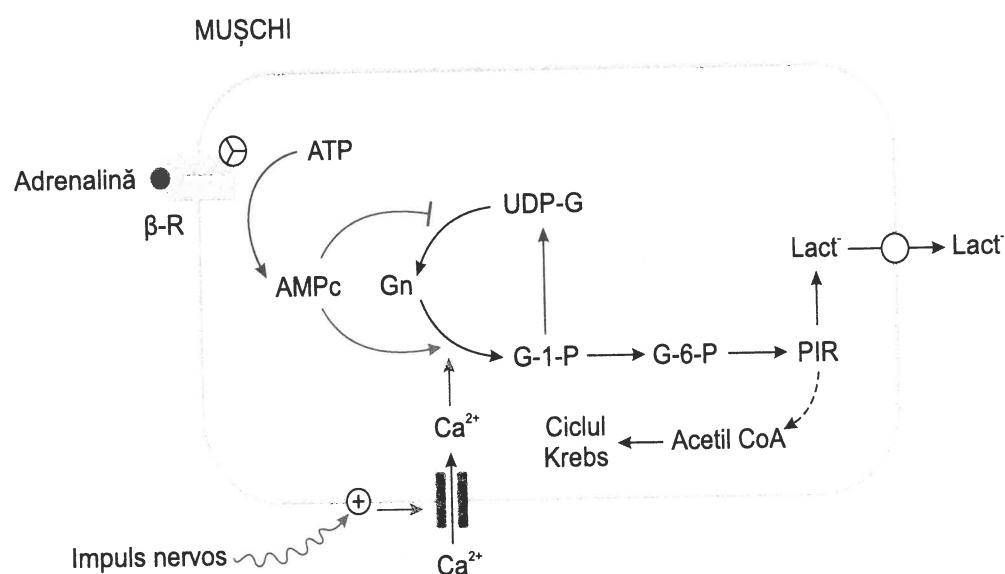


Figura 15.8 Efectul adrenalinei și acetilcolinei asupra miocitului – activarea glicogenolizei și glicolizei musculare în timpul exercițiului fizic

Tabel 15.I Glicogenozele ereditare

Tip	Denumire	Defecțiune enzimatică	Localizare	Semne/ Simptome
I	von Gierke	Glucoză-6-fosfataza	ficat, rinichi, intestin	hepatomegalie, hiperuricemie, hipoglicemie, hiperlipidemie
II	Pompe	Amilo- α (1,4)-glucozidaza	lizozomi	cardiomegalie, slăbiciune musculară
III	Forbes, Cori	Amilo- α (1,6)-glucozidaza	ficat, mușchi, cord	hepatomegalie, hipoglicemie
IV	Andersen	Amilo- α (1,4-1,6)-transglucozidaza	ficat	ciroză hepatică, ascită
V	McArdle	Fosforilaza musculară	mușchi	oboseală, crampe musculare
VI	Hers	Fosforilaza hepatică	ficat	hepatomegalie, hipoglicemie
VII	Tarui	Fosfofructo-kinaza	ficat	hepatomegalie, hipoglicemie
VIII		Fosfohexoizomeraza	ficat	oboseală
IX		Fosforilaza b kinaza	mușchi	oboseală, crampe

1) descompunerea fosfo-enol-piruvatului, 2) descompunerea acidului 1,3-difosfoglicerici și 3) fosforilarea glucozei. Primul by-pass se realizează în felul următor: în granulele membranei exterioare a mitocondriilor, acidul piruvic fixează o moleculă de CO_2 și se transformă în acid oxalacetic (reacție catalizată de piruvat carboxilază). Pentru a depăși bariera de permeabilitate a membranei mitocondriale, oxal-acetatul se reduce la malat, acesta iese în citosol (naveta malat-oxalacetat), unde se reoxidează la oxalacetat și se decarboxilează sub acțiunea fosfoenolpiruvat carboxikinazei (folosește GTP ca și substrat) în fosfoenol-piruvat. Inversarea reacțiilor următoare înaintază până la ocolirea următoarei faze ireversibile, a formării a fructoză 1,6-difosfatului (catalizată de fosfo-fructokinaza 1); această reacție este ocolită prin utilizarea fructoză 1,6-bisfosfatazei. Cea de a treia etapă ireversibilă (formarea G-6-P) este ocolită de glucoză-6-fosfatază. Gluconeogeneza este un proces extrem de eficient și modest endergonic - fiecare mol de piruvat transformat în glucoză consumând 4 moli de ATP.

Piruvatul se formează în primul rând din glicoliză, dar provine și din alanină, serină, cisteină, glicină, treonină. Transformarea lui enzimatică reductivă (sub acțiunea lactat dehidrogenazei - LDH) în acid lactic, înseamnă în același timp și regenerarea NAD^+ -ului care asigură desfășurarea glicolizei în condiții anaerobe. Sub acțiunea transaminazelor, alanina se transformă ușor în piruvat, deschizând astfel, prin unii componenți ai ciclului acizilor tricarboxilici, calea transformării în glucoză a aminoacizilor glucogenetici. În mitocondrii (prin fixare de bioxid de carbon) piruvatul se transformă în oxalacetat, pe de o parte inițiatorul ciclului acizilor tricarboxilici, pe de altă parte al ocolirii inversării descompunerii fosfoenol-piruvatului. Prin faptul că oxalacetatul este utilizat atât în ciclul acizilor tricarboxilici, cât și în gluconeogeneza, în cazul unei inhibiții a ciclului Krebs printr-un exces de ATP, oxalatul poate fi dirijat spre gluconeogeneza, iar în caz de deficit de ATP - spre descompunere. În sfârșit, prin decarboxilare piruvatul se transformă în acetat activ (acetyl-CoA). Acetatul activ (acetyl-CoA) provine în mare parte din decarboxilarea oxidativă a piruvatului și β -oxidarea acizilor grași, dar și din dezaminarea aminoacizilor cetogenetici. Acest fragment C_2 se descompune mai mult în ciclul acizilor tricarboxilici, dar se poate condensa în produsul C_6 (numit 3-hidro-

xi-3-metil-glutaril-CoA) precursor atât al corpurilor cetonici, cât și al sterolilor (colesterolul, acizii biliari, hormonii steroizi).

Lactatul parcurge ciclul Cori: este produs continuu în hematii și mușchi prin descompunerea parțială a glucozei (oxidare anaerobă). Lactatul este transportat pe cale sanguină la ficat unde se transformă în glucoză și reia ciclul (Figura 15.9 a).

Ciclul alaninei (Figura 15.9 b) este în strânsă interrelație cu biosinteza ureei. Alanina se formează în cea mai mare parte în mușchi din piruvatul rezultat în urma glicolizei anaerobe, sub acțiunea GPT (ALT); pe cale sanguină ajunge în ficat, unde ia parte la gluconeogeneză, iar glucoza care se formează este folosită de către hematii, țesutul nervos sau muscular.

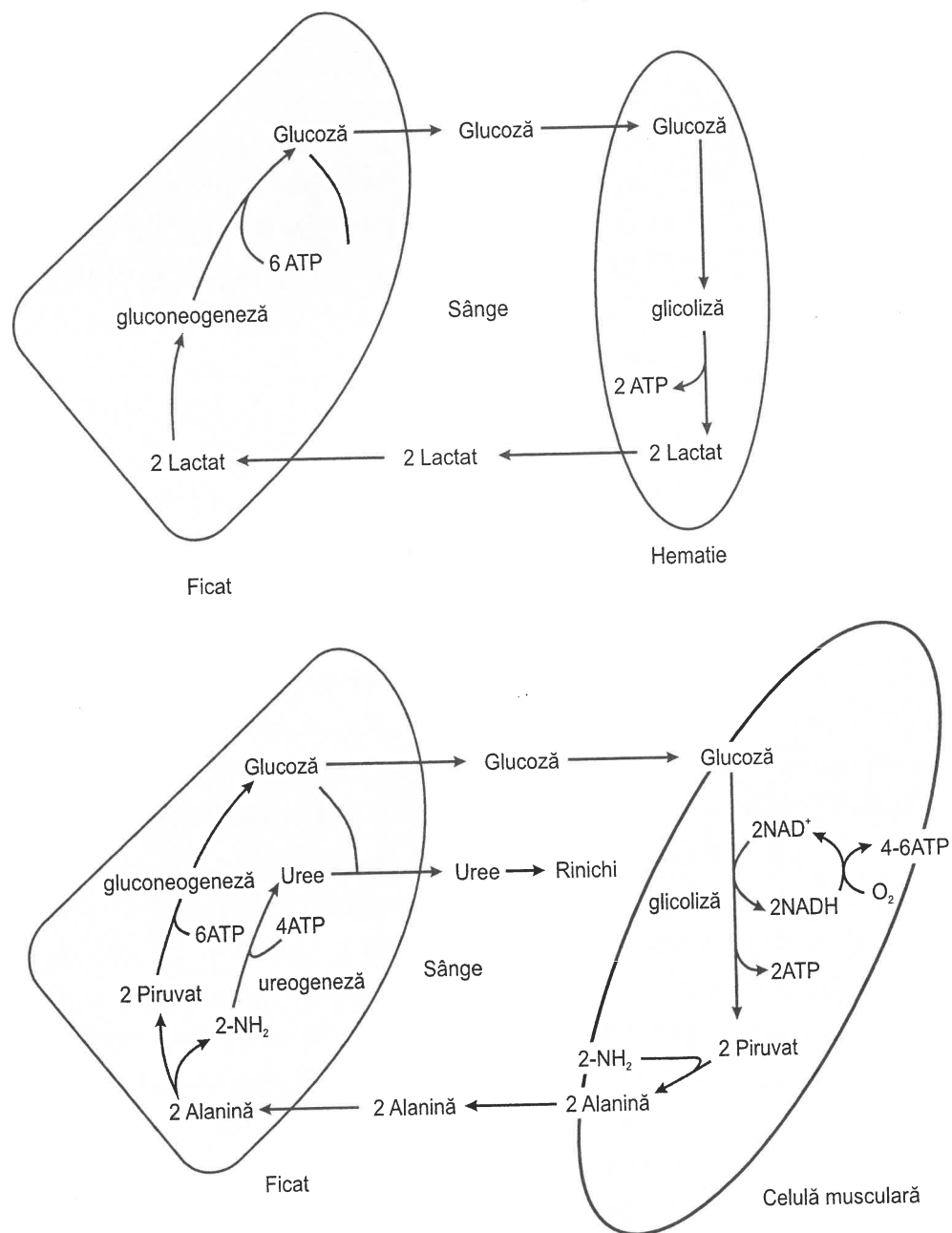
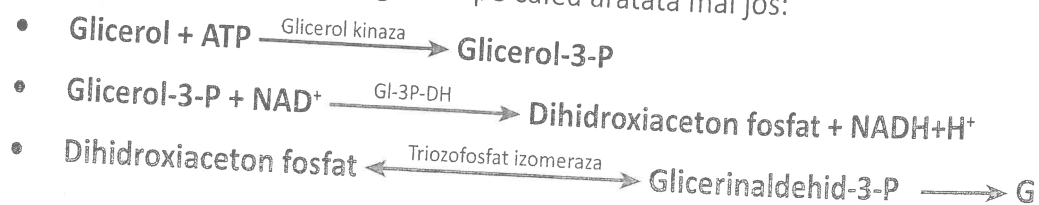


Figura 15.9 Ciclul lactatului - Cori (a) și ciclul alaninei (b)

Glicerolul participă la gluconeogeneză pe calea arătată mai jos:



Reiese că reglarea reacțiilor glicolizei și ale gluconeogenezei se manifestă în sens opus: în cazul în care transformările dintr-un sens se desfășoară cu o intensitate mare, reacțiile în sens invers abia funcționează sau sunt blocate. Enzima cheie a gluconeogenezei este fructoza-1,6-difosfataza, a cărei activitate este puternic inhibată de AMP (produs de descompunere al ATP), care în același timp este și un puternic activator al fosfo-fructo-kinazei (vezi 15.3.1.2).

15.2 UTILIZAREA GLUCOZEI DE CĂTRE CELULELE ORGANISMULUI

15.2.1 GLICOLIZA

La baza transformărilor bioenergetice intracelulare ale organismelor heterotrofe, stă inversarea reacțiilor de fotosinteză, adică eliberarea energiei acumulate de organisme autotrofe (plantele verzi), prin absorbția și depozitarea energiei fotonului verde. Celulele organismului utilizează diferit glucoza, toate posedă însă echipamentul enzimatic al căii Embden-Meyerhof (glicoliza anaerobă).

Glicoliza este o cale rapidă, destinată obținerii de energie (în cantitate mică: 2 moli de ATP / moleculă de glucoză) chiar în condiții de anaerobioză.

În anaerobioză, descompunerea glucozei (glicoliza) are loc în 10 etape enzimatice succesive, pornind de la glucoză-6-fosfat (produsul activat format în celule sub acțiunea hexokinazei, respectiv a glucokinazei, prin consumarea unei molecule de ATP) – *Figura 15.10*. Ecuația generală și bilanțul energetic al glicolizei anaerobe, este:



Glucoză-6-fosfatul este produsul reacției catalizate în hepatocite de către hexokinază sau glucokinază, în prezența ATP. Acest produs poate să urmărească mai multe căi de transformare: poate fi defosforilat și eliberat din hepatocite în sângele circulant; sub forma glucoza-1-fosfatului, poate fi fixat în lanțurile polizaharidice ale glicogenului; în cadrul ciclului pentozofosfaților se transformă în riboză-5-fosfat și echivalenți reducători; prin glicoliză, poate fi descompus până la piruvat. Produsul final al glicolizei îl constituie acetatul activat (cuplat cu coenzima A, sub formă de Acetil-CoA), realizând un fond metabolic comun al produșilor identici ai celorlalte substanțe.

Produșii acestui fond comun pot fi utilizați pentru multiple scopuri (acetilări, condensări, conversiuni în aminoacizi, acizi grași, corpi cetonici și steroli), dar marea lor majoritate intră în ciclul acizilor tricarboxilici (Krebs); scheletul de atomi de carbon se transformă în dioxid de carbon, iar echivalenții reduși rezultați se transformă ulterior prin lanțul respirator în apă, cu formare de ATP. În prezența oxigenului, glicoliza este doar o etapă preparatorie în

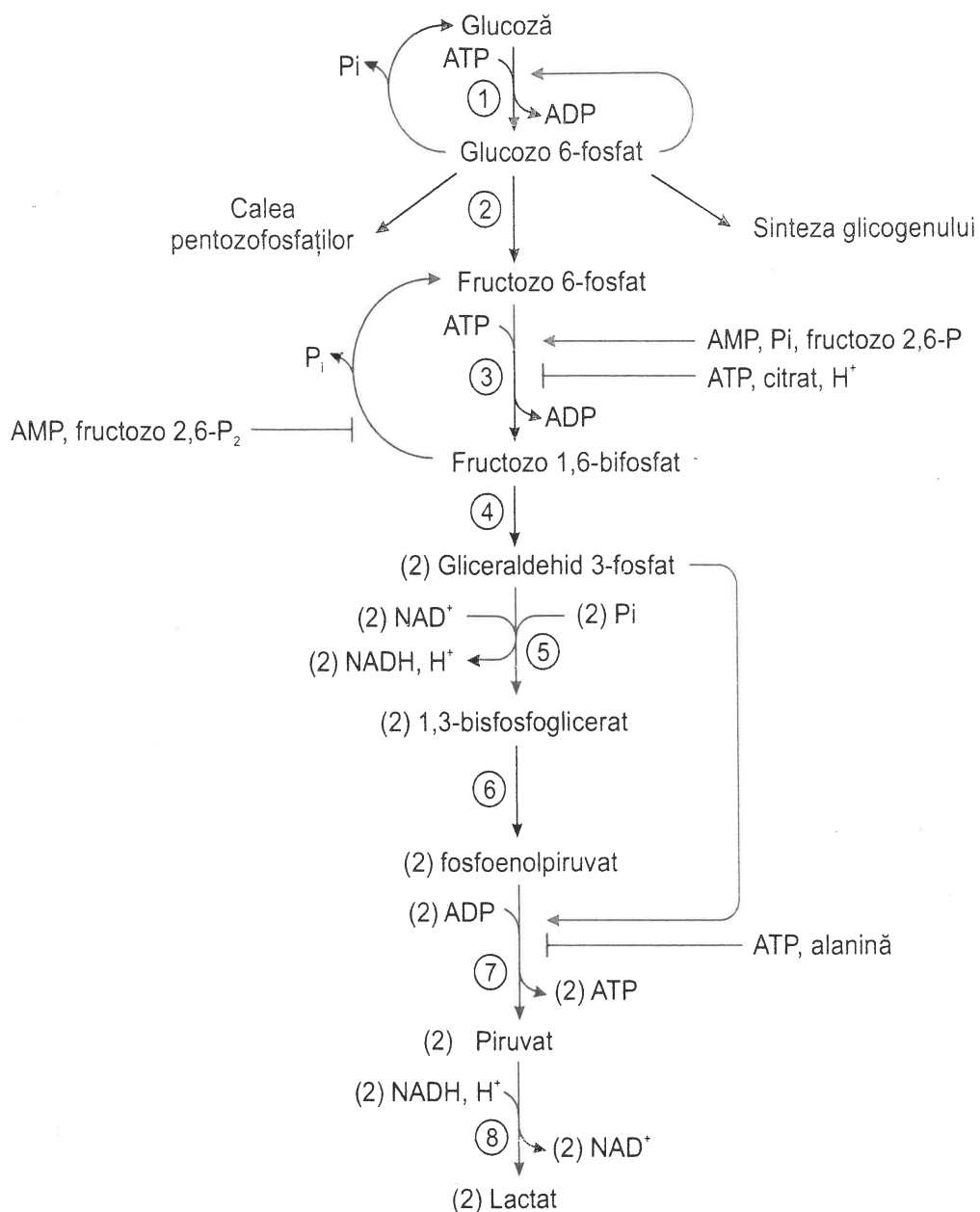
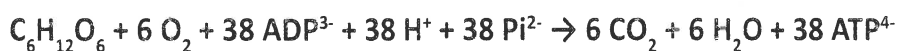


Figura 15.10 Etapele glicolizei și reglarea acestora. Reacțiile sunt catalizate de enzimele:
1. Hexokinaza, 2. Fosfoglucoizomeraza, 3. 6 Fosfofructokinaza, 4. Aldolaza, 5. Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, 6. Fosfoglicerat kinaza/mutaza, 7. Piruvat kinaza, 8. Lactat dehidrogenaza

metabolismul aerob al glucozei. Oxigenul inhibă glicoliza anaerobă (acest fenomen se numește efect Pasteur), fiindcă în prezența oxigenului se produce o cantitate mult mai mare de ATP decât în condiții anaerobe și se formează suficientă energie chiar și în condițiile unei glicolize mai lente.

Ecuția generală și bilanțul energetic al glicolizei aerobe, este:



15.2.2 CICLUL ACIZILOR TRICARBOXILICI: CALEA FINALĂ COMUNĂ A DEGRADĂRII METABOLIȚILOR

În cursul metabolizării substanțelor nutritive fiecare categorie de substanță (aminoacizi, glucide, lipide) se descompune prin reacții biochimice specifice, mai mult sau mai puțin numeroase, în aceleași fragmente simple cu 2 atomi de carbon (C_2 : Acetil-CoA). Cantitatea totală a acestor produși formează un fond metabolic comun, al cărui volum se menține constant prin echilibrul între producție și consum.

De o importanță substanțială este faptul că descompunerea oxidativă a acestor produși C_2 se realizează prin același mecanism comun, indiferent de proveniența lor protidică, glucidică sau lipidică. Aminoacizii ajung la această formă premergătoare, practic prin dezaminarea și decarboxilarea lor succesivă. Acizilor grași le sunt necesare pentru descompunerea în fragmente C_2 cele 4 faze ale β -oxidării (spirală Lynen). În schimb, descompunerea anaerobă a glucozei (glicoliza) cuprinde 10 faze succesive (completate cu decarboxilarea oxidativă a piruvatului), în cursul cărora nu numai că apare produsul final C_2 , dar și o serie de metaboliți, substratele unor procese de biosinteză, respectiv activatori sau inhibitori ai unor enzime cheie.

Ciclul acizilor tricarboxilici (*Figura 15.11*) este o secvență de opt reacții enzimaticе, începând cu condensarea unui fragment C_2 (acetatul activ) cu unul C_4 (acidul oxalacetic); se formează un compus C_6 (acidul citric), sub acțiunea unei enzime de condensare (citratur sintaza). Oxalacetatul se regenerează la parcurgerea completă a ciclului. Din cele patru oxidări care au loc în ciclu, două implică decarboxilare. În cursul transformărilor succesive ale ciclului, cei 2 atomi de carbon ai acetatului activ, se transformă în bioxid de carbon, însă practic fără degajare directă de energie. Eliberarea propriu-zisă a energiei, se realizează prin oxidarea atomilor de hidrogen al acetatului, fixați de către coenzimele dehidrogenazelor (NAD^+ , FAD), care astfel se reduc ($NADH$, $FADH_2$) în cele patru reacții redox: trei produc $NADH$, iar una – $FADH_2$. În reacția a cincea are loc o fosforilare la nivel de substrat, în urma căreia se produce GTP .

Desfășurarea continuă a ciclului se asigură prin regenerarea oxalacetatului și reoxidarea coenzimelor în lanțul de oxidare biologică și transmiterea separată, sub formă de protoni (H^+) și electroni (e^-) a hidrogenului spre oxigenul molecular. Ioni de H^+ rămân acumulați în matricea mitocondriilor, producând un gradient însemnat de H^+ , iar electronii se transportă prin sistemul hemenzimelor (citocromii b, c și a3), component al lanțului de oxidare biologică.

Cantitatea de energie liberă a reacției de ardere a hidrogenului în atmosfera de oxigen (a formării apei) nu se eliberează dintr-o dată, ci în 3 etape, în cursul cărora se formează câte un compus macroergic (ATP). Astfel, în cursul formării oxidative a fiecărei molecule de apă, se sintetizează 3 molecule de ATP, ceea ce înseamnă, că valoarea raportului dintre cantitatea oxigenului consumat și a fosfatului macroergic format este: $P/O = 3$. Această valoare corespunde unui randament de 40 % al utilizării energiei libere a substratelor oxidate, valoare mult superioară randamentului motoarelor cu ardere internă. La fiecare parcurgere a ciclului Krebs, descompunerea unui mol de Acetil-CoA, generează suficiente coenzime reduse pentru sinteza în lanțul de oxidare biologică a 11 moli de ATP; adăugând compusul

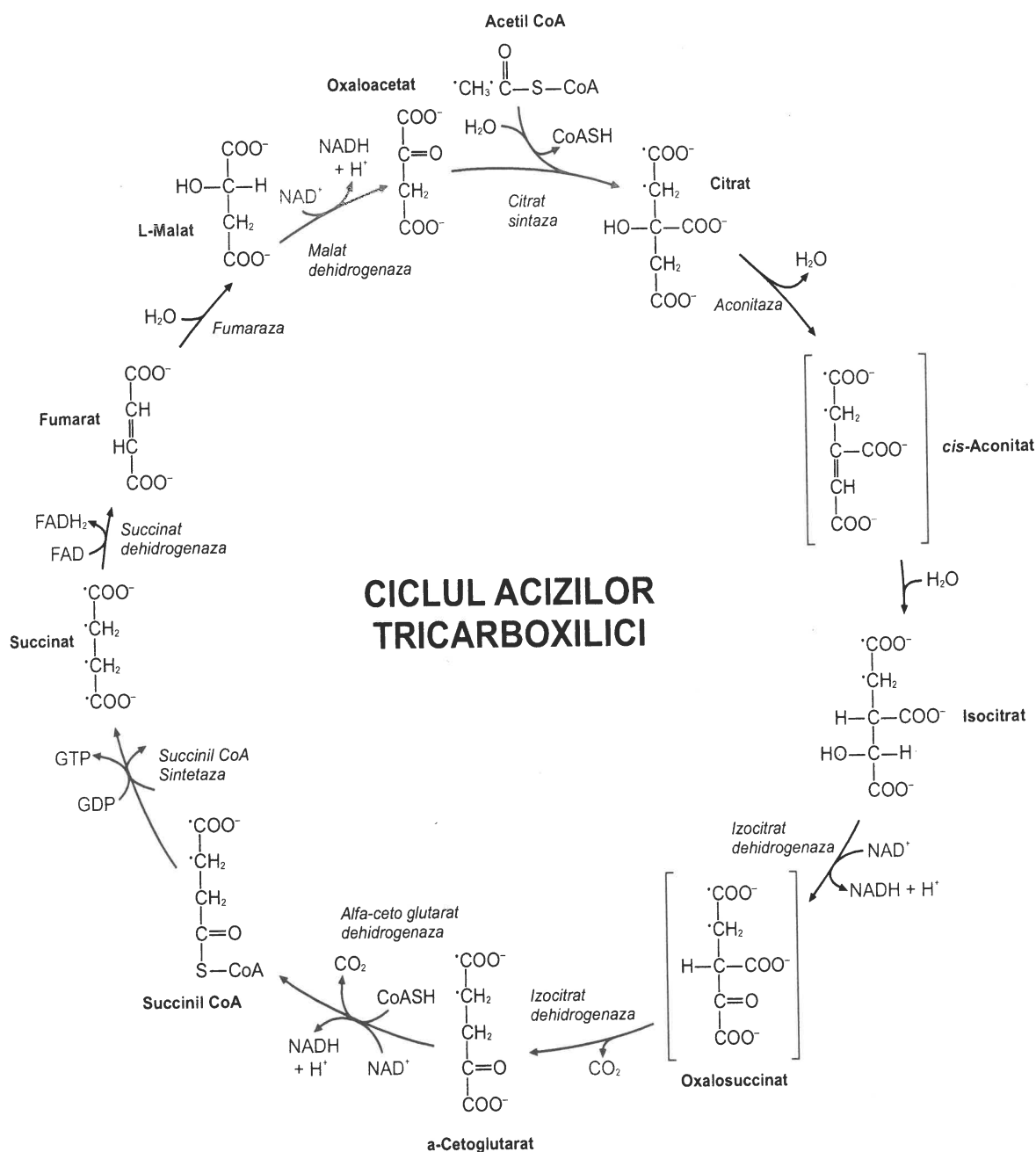


Figura 15.11 Succesiunea reacțiilor în ciclul acizilor tricarboxilici (Krebs)

macroergic (GTP) rezultat în fosforilarea la nivel de substrat, bilanțul descompunerii unui mol de Acetil-CoA este de 12 echivalenți ATP.

Unele substanțe toxice, ca meta-dinitro-benzenul (mDNB), decuplează oxidarea hidrogenului de etapele fosforilării, adică de înmagazinarea energiei libere în ATP. Această decuplare poate să se manifeste la unul, sau la toate nivelele fosforilării. În funcție de numărul treptelor decuplate, scade și valoarea P/O, la 2 respectiv la 1. Decuplarea totală a oxidării și fosforilării (P/O = 0) este incompatibilă cu viața.

Intermediarii ciclului acizilor tricarboxilici participă în diverse procese biosintetice; consumarea anumitor intermediari (de exemplu a Succinil-CoA pentru sinteza hemului) conduce la necesitatea anaplerozei (realimentării ciclui Krebs); acești intermediari nu se pot sintetiza

în interiorul ciclului (din Acetil -CoA), iar în lipsa "alimentării" din exterior, ciclul se sistează. Există câteva reacții anaplerotice care garantează faptul că acest ciclu nu se va împotmoli niciodată din lipsă de intermediari: piruvat carboxilaza catalizează o astfel de reacție (sintetizează malat), GOT catalizează obținerea alfaacetoglutaratului din glutamat, iar aminoacizii glucoformatori pot furniza piruvat sau alți intermediari ai ciclului Krebs.

15.2.3 CICLUL PENTOZOFOȘFAȚILOR

O ramură importantă a glicolizei localizate în citoplasmă este ciclul pentozofosfaților, pornit prin oxidarea glucozo-6-fosfatului (dehidrogenat de către NADP+). 60% din NADPH-ul produs în organism rezultă din această reacție; NADPH este extrem de important în diminuarea efectelor stresului oxidativ, este însă utilizat și ca donator de hidrogen în cursul variatelor procese de biosinteză (de ex. a acizilor grași, colesterolului, hormonilor steroizi sau acizilor biliari), astfel încât această cale metabolică este una mai degrabă anabolică. Pentozele produse în cantități însemnate în acest ciclu, sunt importante în procesele de sinteză ale acizilor nucleici.

Ciclul pentozofosfaților este divizat într-o fază redox ireversibilă (din care rezultă NADPH și pentozofosfații) și o fază reversibilă, a interconversiilor excesului de pentozofosfați neutilizați în intermediari ai glicolizei (F-6-P și Glicerinaldehid-3-P).

15.2.4 CĂILE MAJORE DE METABOLIZARE A GLUCOZEI ÎN DIVERSE ȚESUTURI

15.2.4.1 Hematia

În hematii are loc:

- Glicoliza anaerobă (aproximativ 90% din glucoza utilizată de hematii).
- Calea pentozo-fosfaților, a cărei rol major este producerea de pentoze (componente importante ale acizilor nucleici) și producerea de NADPH + H⁺, necesar regenerării (reducerii) glutatationului (G-SH). G-SH este indispensabil în menținerea integrității ADN-ului, a membranelor celulare și ale organelor subcelulare.

15.2.4.2 Celula nervoasă

La acest nivel are loc:

- Glicoliza completată cu decompunerea aerobă (ciclul Krebs și lanțul de oxidare biologică),
- Calea pentozofosfaților.

Pătrunderea glucozei în celulele nervoase și în hematii este insulino-independentă (se realizează prin intermediul transportorilor GLUT1 și GLUT3).

15.2.4.3 Celula musculară

În mușchi are loc:

- Glicogenogeneza și glicogenoliza;
- Glicoliza anaerobă +/- aerobă;
- Ciclul pentozo-fosfaților.

15.2.4.4 Adipocitul

În țesutul adipos are loc:

- Ciclul pentozofosfaților, care produce NADPH necesar sintezei “de novo” a acizilor grași (componente ale trigliceridelor).
- Glicoliza anaerobă are ca intermediar glicerol-3-fosfatul (se poate utiliza și la sinteza trigliceridelor), iar piruvatul prin decarboxilare oxidativă produce acetil-coenzimă A, materia primă a sintezei acizilor grași.
- Glicogenogeneza și glicogenoliza sunt limitate. În țesutul muscular și în adipocite, glucoza intră în celule stimulată de insulină (prin intermediul transportorului GLUT4).

15.2.4.5 Hepatocitul

În ficat au loc (Figura 15.12):

- Ciclul pentozofosfaților, care produce pentoze necesare sintezei acizilor nucleici, ATP-ului, și NADPH-ul folosit la sinteza acizilor grași și pentru regenerarea glutatationului.
- Glicogenogeneza/glicogenoliza
- Glicoliza anaerobă/aerobă: în ficat prima enzimă a acestei căi este glucokinaza, spre deosebire de alte țesuturi (mușchi, creier, etc.), unde primul catalizator este hexokinaza.
- Gluconeogeneza din compuși cu trei atomi de carbon (lactat, piruvat, alanină);
- Sinteza lipidelor (trigliceride, colesterol etc.);
- Sinteza acidului glucuronic, acesta fiind necesar detoxificării bilirubinei (prin procesul de glucuronoconjugare), a medicamentelor și a altor substanțe toxice pentru organism.

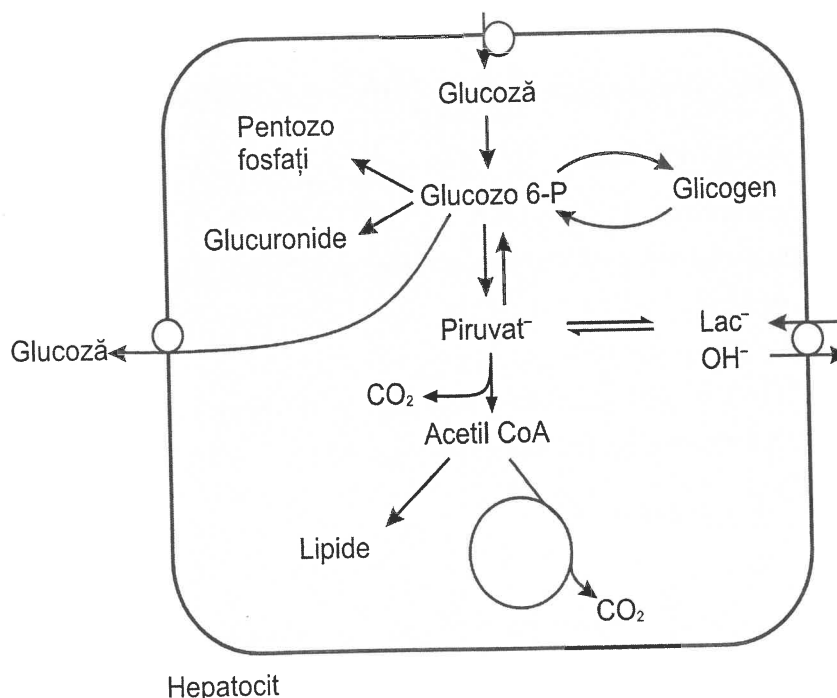


Figura 15.12 Căile de utilizare a glucozei în hepatocit

15.3 MECANISMELE DE REGLARE ALE METABOLISMULUI

Coordonarea în spațiu și timp a reacțiilor biochimice din organism necesită prezența și funcționarea unui sistem complex de reglare, care controlează totalitatea transformărilor, de la cele mai simple până la cele mai complexe. Scopul fundamental al acestei coordonări, îl constituie pe de o parte menținerea continuă a structurilor și a funcțiilor ordonate ale celulei, iar pe de altă parte, adaptarea neîntreruptă a acestora la condițiile mereu schimbătoare ale mediului.

Mecanismele de reglare ale metabolismului celular, se bazează pe următoarele criterii:

- asigurarea eterogenității spațiului biologic prin existența diferitelor compartimente intracelulare delimitate. Acest aranjament compartimentat intracelular asigură cuplarea reciprocă, prin interacțiuni cooperative, a funcțiilor localizate într-un compartiment, cu structurile funcționale din alte compartimente delimitate. Din această cauză, funcțiile integrate prin cooperare (din punctul de vedere al randamentului), vor reprezenta totdeauna mult mai mult decât suma algebrică a capacității funcționale a elementelor constitutive individuale.
- dinamismul metabolismului: reacțiile de biosinteză și de descompunere se desfășoară paralel. Alternarea sensului metabolic între aceste două transformări opuse, se stabilește (de la moment la moment) de starea funcțională a diferitelor fonduri metabolice comune.
- reglarea retroactivă (feedback) se manifestă la nivelul reacțiilor reversibile individuale. Acumularea produsului, din cauza neutilizării lui, inhibă imediat desfășurarea transformării, prin inversarea desfășurării reacției.
- reglarea vitezei și modificarea sensului unor lanțuri (succesiuni) de reacții, prin modificarea desfășurării reacțiilor de reglare având viteza de reacție cea mai lentă, dintre cele cuprinse în serie. Aceste reacții de reglare se situează la punctele nodale ale transformărilor metabolice, ca formarea glucoză-6-fosfatului, a piruvatului, a acetil-CoA, a fructoză-2,6-bisfosfatului.

15.3.1. REGLAREA GLICOLIZEI

Există trei enzime cheie în cadrul glicolizei: hexokinaza, 6-fosfofructo-kinaza, piruvat-kinaza. Enzima reglatoare este subiectul controlului unei căi metabolice prin efectori allostERICI sau modificări covalente. Datorită controlului impus asupra enzimei reglatoare, aceasta va cataliza reacții de "non-echilibru", în timp ce restul enzimelor catalizează în general reacții "de echilibru".

15.3.1.1 Hexokinaza și glucokinaza

Hexokinaza se găsește în diferite țesuturi sub forma diferitelor izoenzime. Majoritatea au $K_M = 0,1 \text{ mmol/L} = 18 \text{ mg/dL}$ (concentrația glucozei sanguine fiind în medie de $5 \text{ mmol/L} = 90 \text{ mg/dL}$). Acesta este un aspect foarte important mai ales pentru neuron, care are acces astfel la glucoză, chiar la concentrații mici ale glucozei sanguine. Hexokinaza este inhibată de produsul de reacție: glucozo-6-fosfat, aspect important deoarece împiedică utilizarea întregului fosfat intracelular în formarea compușilor fosforilați.

Glucokinaza este o izoenzimă a hexokinazei aflată doar în hepatocit, are $K_M = 10 \text{ mmol/L}$, ceea ce acordă ficatului proprietatea de a "tampona" nivelurile crescute ale glicemiei în perioadele postprandiale. Glucoza străbate liber membrana hepatocitului, cu o rată de traversare direct proporțională cu concentrația glucozei sanguine. Insulina facilitează transcripția genei glucokinazei, enzima nefiind inhibată de produsul de reacție (glucozo-6-fosfat), ca și hexokinaza.

15.3.1.2 6-fosfofructo-1-kinaza

Aceasta este enzima limitantă de viteză în calea glicolitică, este un tetramer cu 340 kDa. Efectorii alosterici pozitivi sunt AMP, fructozo-2,6-difosfatul, fosfatul anorganic, iar efectorii negativi sunt ATP, citratul, protonii. Controlul hormonal asupra 6 fosfofructo-kinazei-1 se realizează prin intermediul AMPc și fructozo-2,6-difosfat.

Rata glicolizei se va modifica în funcție de:

- statusul energetic celular (raportul ATP/AMP, fosfat anorganic),
- disponibilitatea surselor de energie alternative: acizi grași liberi, corpi cetonici,
- pH-ul intern celular (concentrația protonilor),
- raportul sanguin insulină/ glucagon (prin fructozo-2,6-difosfat).

Fructozo-2,6-difosfatul ($F-2,6-P_2$) este un compus prezent în toate țesuturile, recent descoperit, fiind cel mai important reglator pozitiv al fosfofructo-kinazei-1. Deși nu este un intermediar al căii glicolitice, funcționează ca și moleculă reglatoare. Modul de acțiune se cunoaște mai ales în ficat. În principal glucagonul, prin AMPc (ca și messenger secundar) scade nivelul $F-2,6-P_2$ și implicit inhibă glicoliza. Fructoză-2,6-difosfatul este reglatorul principal al glicolizei și al gluconeogenezei în hepatocite. La baza acestui mecanism de reglare stă stimularea, respectiv inhibiția funcționării enzimelor fosfofructokinaza și fructoză-2,6-difosfataza. Cea

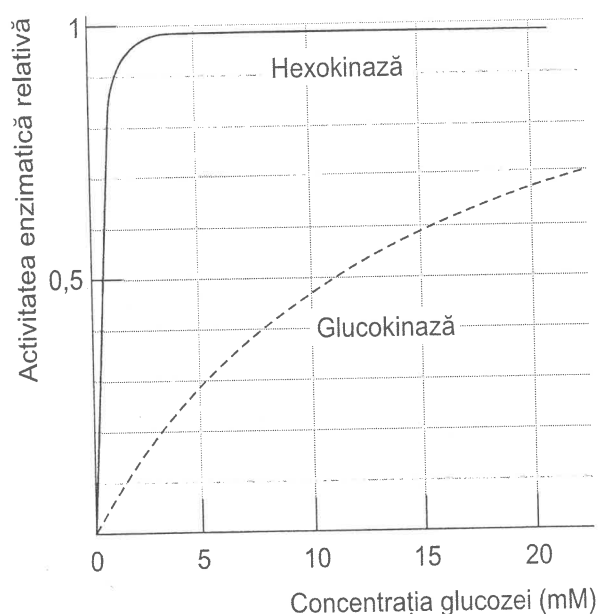


Figura 15.13 Variația vitezei de reacție a hexokinazei și glucokinazei în funcție de concentrația substratului

din urmă, sub formă defosforilată acționează ca o kinază, sub formă fosforilată însă prezintă activitatea unei fosfataze. Schema mecanismului de reglare a glicolizei și a gluconeogenezei de către glucagon, prin intermediul fructoză-2,6-difosfatului, este prezentată în *Figura 15.14*.

În prezența insulinei și a glucozei, enzima se defosforilează (devine activă kinaza), ceea ce duce la creșterea marcată a cantității fructoză-2,6-difosfatului. Ca urmare, fosfofructokinaza devine activă, glicoliza se desfășoară în mod normal, dar se oprește gluconeogeneza.

Sinteza F-2,6-P₂

Se realizează prin fosforilarea F-6-P sub acțiunea fosfofructo-kinazei-2. Fosfofructo-kinaza-2 este o enzimă bifuncțională (PFK-2/F-2,6-P₂-aza), activitatea depinzând de fosforilarea ei (a = forma activă, b = forma inactivă):

- în formă nefosforilată este activ domeniul kinazic;
- în forma fosforilată este activ domeniul fosfatazic.

Glucagonul, prin AMPc, favorizează forma fosforilată (în această formă este inactivă kinaza și activă fosforilaza), scade concentrația fructozo-2,6-difosfatului, scade activitatea fosfofructo-kinazei-1, astfel inhibă glicoliza. Insulina prin facilitarea descompunerii AMPc, inhibă activitatea proteinkinazei AMPc dependente, favorizează forma defosforilată (activă kinaza / inactivă fosforilaza), crește concentrația fructoză-2,6-difosfatului, crește activitatea fosfofructo-kinazei-1 - astfel accelerează glicoliza.

În prezența glucagonului, enzima fructoză-2,6-difosfataza din hepatocite se fosforilează. În consecință, scade cantitatea fructoza-2,6-difosfatului, se inversează raportul dintre cele două enzime cu acțiune opusă (fosfo-fructokinaza / fructoza-2,6-difosfataza), ca urmare, scade intensitatea glicolizei și pornește gluconeogeneza. Excesul de glucoză inhibă în primul rând activitatea fosforilazei, stimularea activității glicogen-sintetazei fiind secundară.

15.3.1.3 Piruvat-kinaza

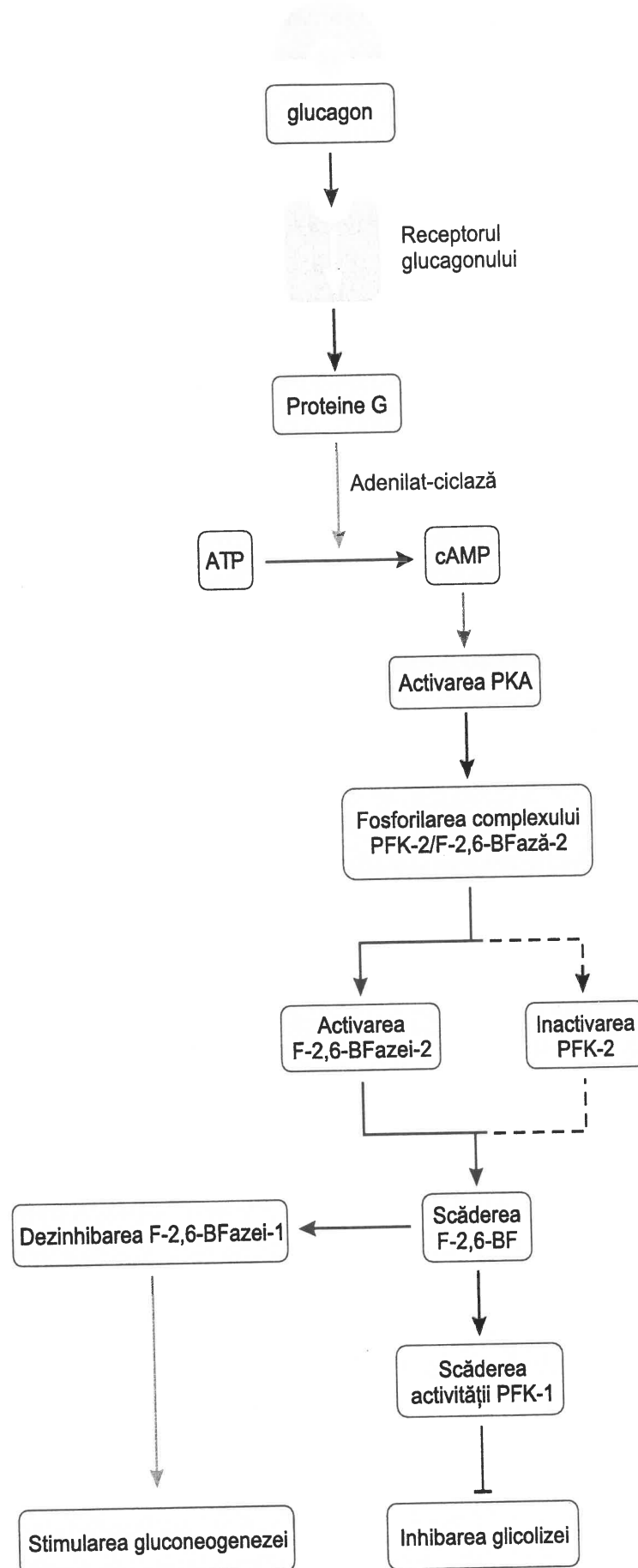
În ficat se găsește izoenzima L, care este activată de creșterea concentrației glucozei și de insulină (nu și în mușchi, unde se află izoenzima M). Piruvat-kinaza este activă în formă defosforilată, glucagonul o inactivează (stimulând fosforilarea enzimei).

15.3.2 CONTROLUL HORMONAL AL NIVELULUI SANGUIN AL GLUCOZEI

În mod normal glicemia variază în limite destul de strânse: a jeun 70-99 mg/dL, postprandial 120-140 mg/dL. După mesele bogate în carbohidrați, hiperglicemia determină creșterea captării intrahepatocitare a glucozei, dar influențează și eliberarea unor hormoni.

Insulina este hormonul hipoglicemiant, iar glucagonul, adrenalina, cortizolul, hormonul de creștere (STH) sunt hormoni contrareglatori (antagonizează efectul insulinei și sunt gluconeogenetici).

Insulina este un hormon polipeptidic cu 51 aminoacizi, produs de celulele β ale insulelor Langerhans pancreatice. Este alcătuit din două lanțuri (A și B) legate prin 3 punți disulfurice (inter- și intracatenare). Insulina este produsă sub formă de pre-proinsulină, care prin scindarea unei porțiuni din lanțul peptidic se transformă în proinsulină. Proinsulina stocată în

Figura 15.14 Mecanismul de inhibare a glicolizei de către glucagon, prin F-2,6-P₂

cisternele aparatului Golgi, are 84 de aminoacizi și este alcătuit din lanțul A (21 aminoacizi), peptidul C (33 Aa) și lanțul B (30 Aa). Clivarea proteolitică a peptidului C între aminoacizii 30 (treonină) și 31 (arginină) determină activarea insulinei. Cantitatea de peptid C este echimolară cu cantitatea insulinei produse, de aceea dozarea peptidului C se poate utiliza pentru a aprecia rezerva secretorie a pancreasului. Peptidul C asigură structura tridimensională și integritatea lanțurilor disulfurice.

Insulina este un hormon anabolic:

- crește captarea glucozei și potasiului în țesutul adipos și muscular;
- stimulează sinteza proteică (crește captarea aminoacizilor în mușchi și ficat);
- facilitează lipogeneza;
- stimulează glicogenogeneza.

Sinteza și secreția insulinei sunt influențate de creșterea concentrației glucozei sanguine, aminoacizilor și GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide sau Glucose-dependent Insulinotropic Peptide – membru al familiei incretinelor). Secreția este bifazică:

- în prima fază (imediată: 5-10 minute) se eliberează aproximativ 2% din cantitatea de insulină, ca urmare a ingestiei de alimente;
- a doua fază (tardivă: ore) are loc pe măsura absorbției glucozei (concertată cu producerea GIP în celulele mucoasei intestinale) și stimularea celulelor β de către glucoză.

Secreția este mai abundentă ca răspuns la testul de încărcare *per os* decât la cel cu administrarea venoasă a glucozei. Explicația acestui fenomen este că hormonii gastro-intestinali, în special GIP (peptidul inhibitor gastric – glucose dependent insulinotrofic peptid), stimulează eliberarea insulinei. Stimularea vagală produce eliberarea insulinei, iar cea simpatică inhibă eliberarea acesteia.

Glucagonul este sintetizat de către celulele α ale insulelor Langerhans. Secreția glucagonului este stimulată de hipoglicemie și aminoacizi gluconeogenetici. Efectele glucagonului sunt: stimularea glicogenolizei hepatice și a gluconeogenezei.

Adrenalina

Hipoglicemia este un potențial stimul pentru secreția adrenalinei. Efectele adrenalinei:

- stimulează glicogenoliza hepatică și musculară;
- inhibă secreția insulinei (crește glicemia);
- stimulează lipoliza și sinteza acizilor grași.

Cortizolul este secretat de către glandele corticosuprarenale. Efectele cortizolului:

- inhibă glicogenoliza hepatică;
- stimulează gluconeogeneza;
- stimulează lipoliza și eliberarea acizilor grași liberi.

Hipoglicemia stimulează secreția **STH (hormonul somatotrop, hormonul de creștere)** de către hipofiză. Efectele STH:

- crește producția hepatică a glucozei;
- scade utilizarea glucozei de către unele țesuturi (posibil datorită lipolizei, cu

eliberarea acizilor grași liberi) - unele țesuturi utilizează preferențial acizi grași liberi ca și sursă energetică (de exemplu țesutul miocardic).

15.3.3 INTERRELAȚII ÎNTRE METABOLISMUL GLUCOZEI, ACIZILOR GRAȘI ȘI AL CORPILOR CETONICI

Glucosa este o sursă importantă de energie pentru toate țesuturile organismului, în special imediat postprandial și la scurt timp după mese. Hematiile și neuronii consumă 80% din glucosa necesară zilnic în organism (aproximativ 200 g), fiind sursa preferată de energie a acestora. În sânge și interstițiu există doar în jur de 10 g de glucoză (la valorile normale ale glicemiei), de aceea aceasta trebuie suplimentată constant pe măsură ce se consumă. După perioade mai lungi de timp fără alimentație, dacă gluconeogeneza ar fi unica sursă de energie, proteinele organismului ar fi rapid consumate.

Mușchii pot utiliza (țesutul miocardic utilizează chiar preferențial) acizi grași, creierul preferă însă corpii cetonici ca și sursă alternativă de energie. Corpii cetonici (β -hidroxi-butilratul, acetoacetatul și acetona) sunt sintetizați în ficat din Acetil-CoA eliberat din abundență în urma catabolismului acizilor grași.

Cantitatea de acizi grași disponibili pentru țesuturile periferice depinde de rata de eliberare a acestora din țesutul adipos sub acțiunea lipazei hormon sensibile. Insulina are efect inhibitor asupra acestei lipaze, în schimb glucagonul, adrenalina, cortizolul și STH stimulează lipaza hormon sensibilă.

Acizii grași „liberi” circulă de fapt legați de albumină; 30% sunt preluați de ficat și utilizați: prin esterificare se transformă în trigliceride, respectiv prin β -oxidare produc acetil-coenzimă A, care poate intra în ciclul Krebs sau participă la formarea corpilor cetonici - raportul între cele două căi este determinat de raportul insulină/ glucagon.

Dacă raportul insulină/glucagon este mare, acesta facilitează lipogeneza și inhibă lipoliza. Raportul insulină/glucagon scăzut favorizează activitatea carnitin-palmitoil-transferazei I (transferă acizii grași intramitocondrial), accentuând lipoliza. Fluxul crescut de acizi grași liberi facilitează sinteza corpilor cetonici și duce la abolirea ciclului Krebs.

15.3.4 REGLAREA GLICEMIEI, CA UN INDICATOR SENSIBIL AL REGLĂRILOR METABOLICE

Conținutul în glucoză al sângelui recoltat pe nemâncate este în medie de 80 – 90 mg/dL. În urma unui consum alimentar, această cantitate poate să crească chiar până la valoarea de 10 mmol/l (180 mg/dL). Menținerea constantă a glicemiei are o deosebită importanță pentru organism, nu numai din cauza rolului energetic al glucozei, dar și pentru faptul că produșii ei de descompunere funcționează ca substrate ale numeroaselor reacții de biosinteză.

Reglarea glicemiei este realizată de către hepatocite. În urma manifestării hiperglicemiei postprandiale, în celulele țesuturilor periferice, moleculele hexokinazei se saturează cu glucoză, ceea ce duce la reducerea considerabilă a ratei de pătrundere în celule a glucozei. În hepatocite însă, la valoarea postprandială obișnuită a glicemiei, glucokinaza nu este saturată

cu glucoză, deoarece are o valoare destul de mare a K_M (10 mmol/L). Din aceasta cauză, glucoză-6-fosfatul se formează în hepatocite mult mai intens în urma creșterii glicemiei din cauza reabsorbției intestinale a glucozei.

Soarta ulterioară a glucozei, de a intra în glicogenogeneză, respectiv glicoliză, lipogeneză sau transformarea ei în unii aminoacizi, este determinată de efectele opuse ale insulinei și glucagonului. Prin receptorii ei specifici, insulina favorizează pătrunderea glucozei în fibrele musculare striate periferice. Datorită masei musculare consistente, aceasta depozitează o cantitate de aproximativ trei ori mai mare de glicogen, decât ficatul. Totuși, glicogenul muscular nu poate servi ca sursă de glucoză sanguină, deoarece în fibrele musculare lipsește glucoză-6-fosfat-fosfataza. Produsul glicolizei, acidul lactic pătrunde însă în sânge și este transportat la hepatocite, unde un sfert din cantitatea lui totală se oxidează și pe seama energiei eliberate, restul se retransformă în glucoză. Această cantitate de glucoză se eliberează din nou în sânge de către hepatocite, este captată de fibrele musculare, unde este utilizată sau se redepozitează sub formă de glicogen muscular.

În mod normal homeostazia glucozei sanguine se află sub controlul balanței Insulină / Glucagon: postprandial (pe perioada absorbției principiilor alimentare) aceasta este înclinată în sensul creșterii insulinei și scăderii glucagonului circulant, iar interprandial (după 6-12 ore de la ultima masă) – în sensul creșterii glucagonului și scăderii insulinei circulante.

15.3.5 Controlul postprandial al glicemiei

Ingestia de alimente transferă imediat statusul metabolic dinspre catabolism înspre anabolism. Creșterea concentrației insulinei stimulează stocarea excesului energetic sub formă de trigliceride, glicogen și proteine (*Figura 15.15*).

S-a estimat că din 100 g glucoză absorbită 60 g sunt folosite pentru glicogenogeneza hepatică, 25 g intră în țesuturile dependente de insulină, iar 15 g pătrund în țesuturile insulino-independente.

Postprandial sunt inhibitate glicogenoliza, lipoliza și proteoliza. Creșterea concentrației glucozei plasmatice inhibă acțiunea glucagonului și acest efect se completează cu creșterea insulinemiei.

Insulina are rolul de a transloca glucoza din spațiul extracelular spre cel intracelular, spre utilizare directă sau stocare sub formă de rezerve (glicogen, trigliceride, proteine).

În concluzie, glucoza este stocată în momentele de abundență energetică sub acțiunea insulinei pentru perioadele cu deficit energetic, când este eliberată de hormoni cu acțiune hiperglicemiantă (glucagonul, adrenalina, cortizolul, tiroxina, hormonul de creștere).

15.3.6 METABOLISMUL INTERPRANDIAL

Perioada interprandială este caracterizată ca având specific catabolic: rezervele macromoleculare (glicogen, trigliceride) sunt descompuse în fragmente și particule elementare care ulterior cedează energia lor în procese (lanțuri) oxidative (*Figura 15.16*).

Interprandial concentrația insulinei este 5-25 mU/ml, secreția fiind de 0,2-1 U insulină/oră. Această cantitate de insulină este suficientă pentru a menține un control precis al catabolismului în țesutul adipos, dar este insuficientă pentru a asigura pătrunderea glucozei

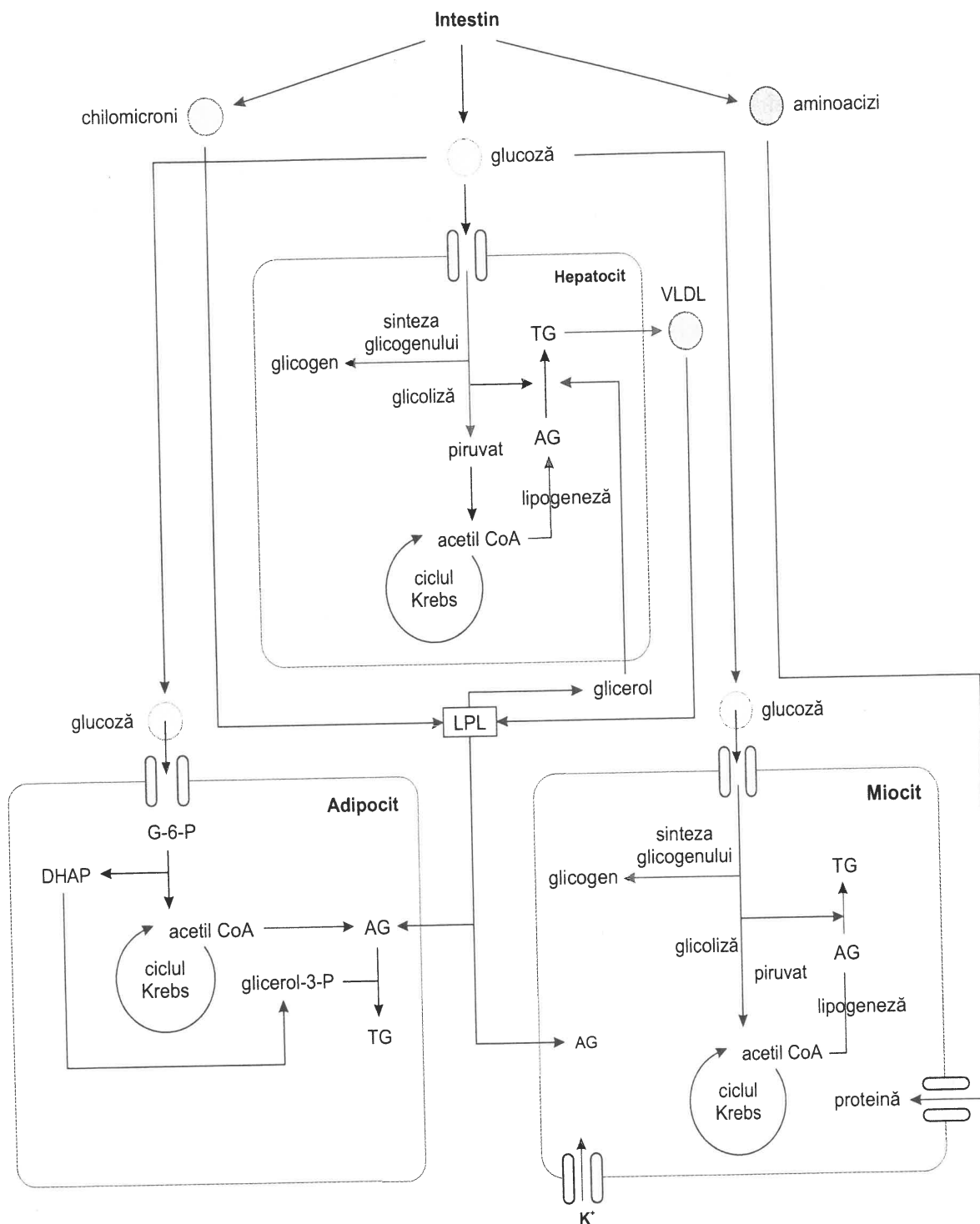


Figura 15.15 Schema metabolismului postprandial – efectele metabolice ale insulinei

În țesuturile insulino-dependente, astfel glucoza va fi disponibilă pentru țesutul nervos și hematii ($\gg 10$ g glucoză / oră). Creșterea concentrației glucagonului intensifică glicogenoliza și gluconeogeneza hepatică, dar și lipoliza în țesutul adipos. Astfel se eliberează o cantitate de acizi grași și glicerol suficientă țesutului muscular și miocardului.

Rezervele energetice ale unui om de 70 kg sunt alcătuite dintr-o cantitate de glicogen echivalentă cu 1.600 kcal, de proteine mobilizabile egale cu 24.000 kcal și de grăsimi neutre echivalente cu 160.000 kcal. Pentru acoperirea necesarului energetic de 1.600 kcal/zi al unui

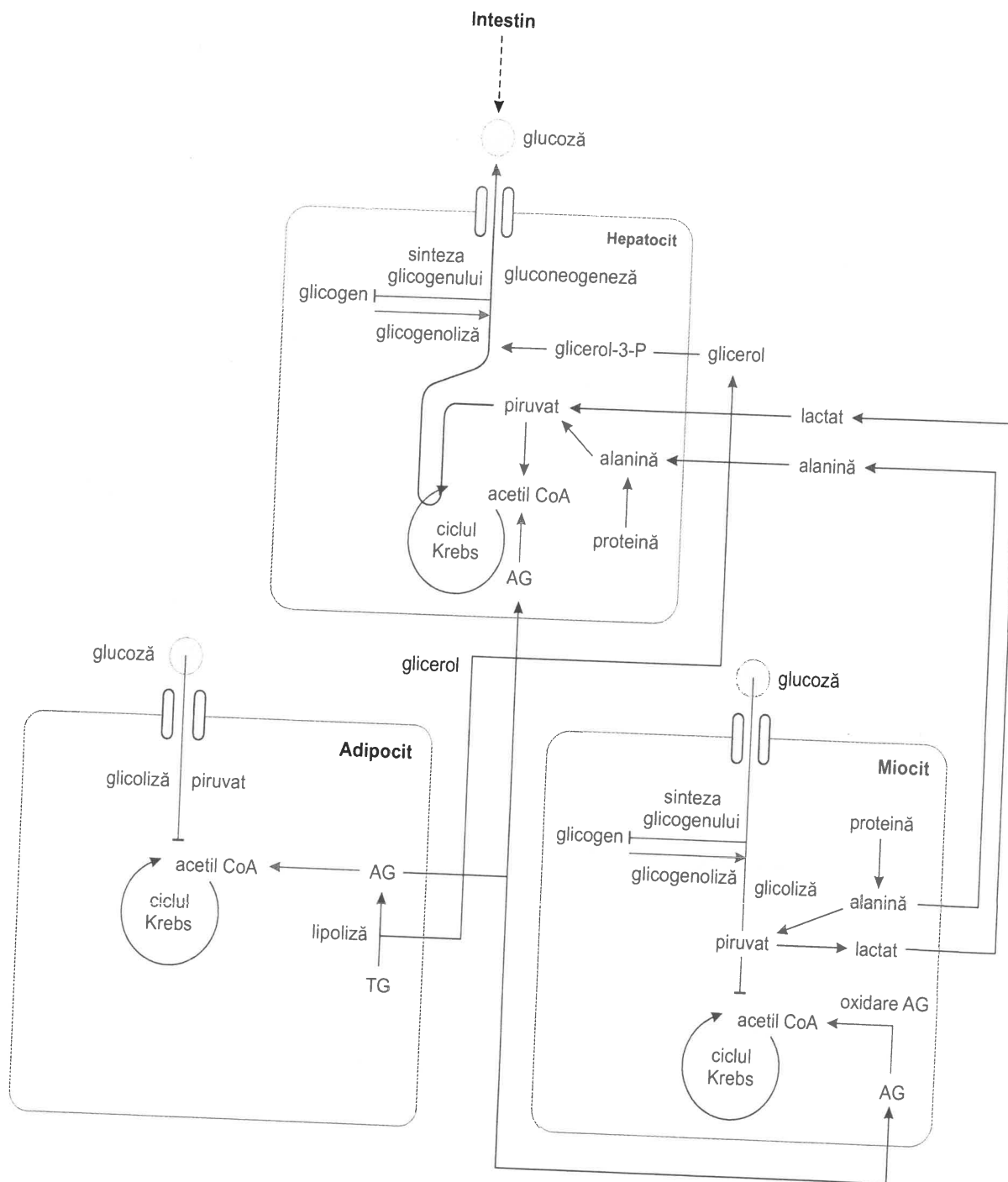


Figura 15.16 Schema metabolismului interprandial precoce

organism adult în repaus, această cantitate de energie depozitată ar fi suficientă, chiar și pentru trei luni. În schimb rezervele de glicogen ale organismului se epuizează încă în cursul primei zile de foame, în ciuda faptului că datorită gluconeogenezei glicemia nu coboară sub valoarea de 2,8 mmol/l (50 mg/dL). Celulele cele mai sensibile la hipoglicemie sunt neuronii, care dispun doar de rezerve minime de glicogen. Hipoglicemiile severe (sub 2,5 mmol/L – 45 mg/dL) compromit funcțiile neuronale, conducând la confuzie, dezorientare și chiar comă severă.

În cursul unei carențe alimentare de durată, cantitatea de glucoză necesară organelor consumatoare permanente de energie este asigurată prin gluconeogeneză, adică prin transformarea în glucoză a aminoacizilor glucogenetici proveniți din descompunerea proteinelor proprii. Este de remarcă că la bolnavii cu diabet zaharat insulinodependent neechilibrat, în ciuda valorilor ridicate ale glicemiei, celulele insulinosensibile nu pot prelua glucoza din sânge și se află într-o stare carențială de glucoză. Pe termen mai lung, această neproducție internă de glucoză, duce la descompunerea proteinelor și astfel la unele dereglări ireparabile.

Dimensiunile gluconeogenezei sunt condiționate de cantitatea aminoacizilor, proveniți din descompunerea proteinelor. Consumul proteinelor endogene în stările carențiale este contrabalansat prin descompunerea rezervelor grăsoase. Glicerolul eliberat este canalizat spre glicoliză, respectiv spre resinteza grăsimilor, iar acizii grași liberi spre oxidare și cetogeneză. Reiese, că în stările carențiale (și în diabetul zaharat insulinodependent), sursa unică a gluconeogenezei o constituie aminoacizii glucogenetici. Carența alimentară de durată duce la descompunerea proteinelor musculare, cu scăderea treptată a volumului musculaturii. Paralel cu aceasta, crește din ce în ce mai mult lipoliza și arderea cetogenetică a acizilor grași.

Înfometarea de lungă durată este echivalentă cu un status cronic hipoinsulinemic, cu creșterea glucagonului (*Figura 15.17*). Creierul se adaptează prin utilizarea corpurilor cetonice ca sursă de energie. Nivelul acizilor grași liberi circulanți crește, acidul oxalacetic este orientat spre gluconeogeneză, iar intensitatea ciclului Krebs diminuează; excesul de Acetil-CoA rezultat prin β -oxidarea acizilor grași, este orientat spre cetogeneză.

15.4 DIABETUL ZAHARAT

Diabetul zaharat este o afecțiune metabolică complexă caracterizată prin hiperglicemie cronică (în principal consecință a deficitului cantitativ de insulină și/sau acțiunii inadecvate a acesteia la nivelul țesuturilor periferice -insulinorezistență). Pe lângă hiperglicemie apar de multe ori și perturbări ale metabolismului intermediar al lipidelor, proteinelor, precum și ale metabolismului hidro-electrolitic și energetic al organismului. În timp, modificările biochimice induse de aceste alterări metabolice conduc la anomalii funcționale celulare, iar în final la modificări structurale ireversibile la nivelul organelor și țesuturilor țintă.

Criteriile de diagnostic ale diabetului zaharat sunt redate în *tabelul 15.II*.

15.4.1 CLASIFICAREA DIABETULUI ZAHARAT

15.4.1.1 Diabetul zaharat tip 1 (DZ tip1)

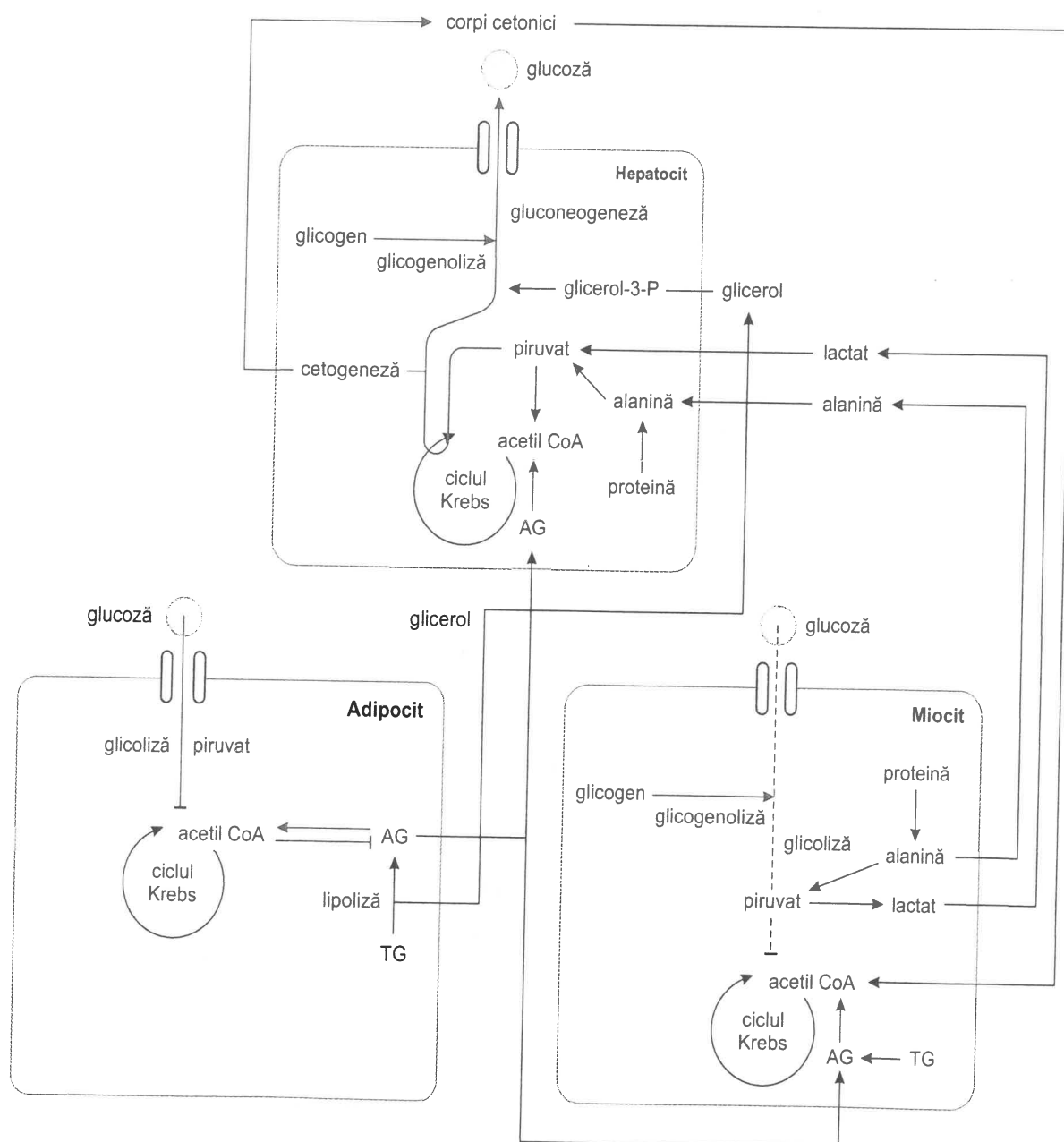
Diabetul zaharat tip 1 este insulino-dependent și se datorează distrugerii mediate imunologic de către limfocitele T a celulelor β din insulele Langerhans, având drept consecință deficiența de insulină.

Reacția autoimună apare la persoanele cu predispoziție genetică și este inițiată de factori trigger din mediu ambiant. Susceptibilitatea genetică este dată mai ales de fenotipurile HLA clasa II DR3 și/sau DR4, dar și HLA clasa I (A1, A24, B8, B18). Dintre factorii de mediu un

Tabel 15.II Criteriile ADA de diagnostic ale diabetului zaharat

1. HbA1c $\geq 6,5\%$
sau
2. Glicemia à jeun ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l)
sau
3. Glicemia la 2 ore (TTGO 75g glucoză) ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l)
sau
4. Glicemia ocazională (la un pacient cu simptome caracteristice de hiperglicemie sau criză hiperglicemică) ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l)

În absența simptomelor de hiperglicemie, primele trei variante trebuie să fie confirmate prin repetarea testului.

**Figura 15.17 Schema metabolismului în diabet zaharat**

posibil rol în dezvoltarea bolii îl au virusul Coxsackie B (în special B4), citomegalovirusul sau virusul oreionului (parotiditei epidemice), dar au fost incriminați și factori alimentari (mai ales consumul de lapte de vacă în primele luni de viață). Atacul autoimun este mediat în primul rând de limfocitele T citotoxice infiltrate la nivelul insulelor Langerhans și este exprimat prin prezența autoanticorpilor circulanți specifici direcționați împotriva componentelor celulelor β pancreatice sau proteinelor circulante (anticorpi ICA (islet-cell antibodies), anti-decarboxilaza acidului glutamic (GAD), anti-fosfotirozin fosfataza (IA-2; insulinoma-associated antigen-2), anti-insulina, anti-transportorul de zinc 8).

Boala debutează de obicei în copilărie / adolescență, cu poliurie, polidipsie, polifagie, scădere în greutate, oboseală și frecvent cu cetoacidoză. Simptomatologia se datorează hiperglicemiei (secundară deficitului de insulină) care cauzează diureză osmotică, manifestându-se prin poliurie (1 mol glucoză are 180 g și necesită minimum 1000 ml apă pentru eliminare). Pierderea unui volum mare de apă pe cale urinară cauzează senzația de sete și polidipsia (consumul unei mari cantități de lichide). Glucoza fiind un combustibil important, pierderea sa se asociază cu pierdere de energie (1 gram glucoză \sim 4.1 kcal) și prin urmare cu scădere ponderală și se compensează prin polifagie (ingerarea unor cantități mari de alimente).

15.4.1.2 Diabetul zaharat tip 2 (DZ tip 2)

Diabetul zaharat tip 2 s-a numit în trecut diabet zaharat non - insulinodependent (NIDDM).

Ereditatea este bine exprimată și în cazul diabetului zaharat tip 2, iar principalele mecanisme fiziopatologice implicate în apariția acestuia sunt reducerea progresivă a secreției insulinei și alterarea acțiunii ei asupra organelor țintă (rezistență la insulină). Cauza rezistenței la insulină poate fi: sinteza unui hormon inadecvat din punct de vedere structural; existența unor anticorpi antiinsulină; scăderea numărului sau afinității receptorilor membranari funcționali pentru insulină la nivelul celulelor periferice; defect funcțional postmembranar datorită deficitului de mesager secund. Factorii determinanți ai insulinorezistenței sunt de natură genetică, sedentarismul, obezitatea, vârsta, stresul. Există și alte mecanisme fiziopatologice implicate în apariția hiperglicemiei în DZ tip 2: creșterea secreției de glucagon la nivelul celulelor α pancreatice, scăderea efectului incretinic, disfuncția neurotransmițătorilor la nivelul sistemului nervos central și creșterea reabsorbției de glucoză la nivel renal.

Diabetul zaharat tip 2 apare de obicei la persoane cu exces ponderal. Debutul bolii are loc de cele mai multe ori la vârsta adultă (> 40 ani) și poate fi în mai puțin de 1/3 din cazuri simptomatic (poliurie, polidipsie, xerostomie, scădere ponderală) sau asimptomatic. Cetoza este rară, datorită faptului că inhibarea lipolizei în țesutul adipos necesită o concentrație mai mică de insulină decât pătrunderea glucozei în mușchi, țesut adipos sau inhibarea glicogenolizei. Cetoza apare uneori când peste DZ tip 2 se suprapune o infecție acută sau o altă situație care pune organismul în stare de "fugă sau luptă" (predomină hormonii hiperglicemianți).

La momentul debutului, un procent crescut de pacienți cu DZ tip 2 prezintă deja una sau mai multe complicații cronice ale bolii (micro- sau macrovasculare).

15.4.1.3 Diabetul Autoimun Latent al Adultului (LADA) – „Diabetul de tip 1.5”

Diabetul autoimun latent al adultului (LADA) este o formă de diabet autoimun, asemănător DZ tip 1, dar care debutează mai târziu (la vârstă adultă) și are o progresie mai lentă către necesar absolut de insulină. Din punct de vedere clinic, pacienții cu LADA prezintă fenotip de DZ tip 2, au autoanticorpi specifici pentru DZ tip 1 (și celule T autoreactive), necesită insulină mai rapid decât subiecții cu DZ tip 2 clasic, însă pot fi tratați cu antidiabetice orale ≥ 6 luni. Se apreciază că aproximativ 10% dintre persoanele adulte diagnosticate cu DZ tip 2, au de fapt LADA. Diagnosticul este stabilit prin evidențierea prezenței autoanticorpilor specifici în circulație (în special anticorpii anti-GAD) la persoane cu DZ peste 30 ani, în lipsa necesității insulinoterapiei cel puțin 6 luni de la diagnostic.

15.4.1.4 Diabet zaharat secundar (diabetul zaharat asociat cu alte afecțiuni)

Afecțiuni cum ar fi pancreatita cronică, tumori, endocrinopatii, hemocromatoza, diverse medicamente, infecții, pot determina apariția unui diabet secundar.

15.4.2 DIABETUL GESTAȚIONAL

Uneori, diabetul zaharat apare pentru prima dată în timpul sarcinii. Glucozuria este comună datorită scăderii pragului de reabsorbție renală a glucozei. În plus, sarcina crește necesarul de insulină pentru menținerea unei stări proanabolice și apare un anumit grad de insulino-rezistență indus de modificările hormonale. Studiile clinice au demonstrat faptul că diabetul gestațional crește riscurile fetale, neonatale și materne, în directă asociere cu glicemia maternă din săptămânile 24-28 de sarcină.

Diagnosticul de diabet gestațional se stabilește doar pe durata sarcinii. Conform recomandărilor actuale, toate gravidele fără diagnostic anterior de diabet, vor fi testate în săptămânile 24-28 de sarcină, prin efectuarea unui test de toleranță la glucoză pe cale orală (TTGO) cu 75 g glucoză, cu măsurarea glicemiei bazale, la 1 oră și la 2 ore. Diagnosticul de diabet gestațional se va stabili dacă oricare din valorile următoare sunt depășite:

- bazal ≥ 92 mg/dl (5.1 mmol/l)
- 1 oră ≥ 180 mg/dl (10.0 mmol/l)
- 2 ore ≥ 153 mg/dl (8.5 mmol/l)

Toleranța la glucoză revine la normal după naștere, totuși persoanele pot dezvolta mai târziu diabet zaharat de tip 2. La 6-12 săptămâni postpartum, este necesară reevaluarea statusului glicemic.

15.4.3 GLICEMIA BAZALĂ MODIFICATĂ ȘI SCĂDEREA TOLERANȚEI LA GLUCOZĂ

Există persoane care au valorile glicemiilor peste limita superioară normală, însă sub valorile prag de diagnostic al DZ. Această categorie intermediară a fost definită ca având glicemie bazală modificată (glicemie plasmatică a jeun repetată între 100-125 mg/dl) sau scăderea toleranței la glucoză (glicemie plasmatică la 2 ore la TTGO cu 75 grame de glucoză între 140-199 mg/dl). Aceste persoane se află la risc crescut de a dezvolta mai târziu diabet zaharat.

TTGO este indicat în astfel de cazuri cu diagnostic incert (valori glicemice à jeun între 100-125 mg/dl sau în mod repetat la limita superioară acceptată, orice situație care ridică suspiciune de diabet zaharat, în special dacă există factori de risc, de exemplu la persoanele cu simptome de diabet fără hiperglicemie evidentă, în caz de glucozurie la gravide).

În cadrul testului se administrează 75 g glucoză anhidră, în 300 ml apă. Testul se efectuează dimineața, după 8-10 ore de repaus alimentar. Pacientul trebuie să fie în repaus fizic în timpul testului, poate consuma apă, însă fumatul este interzis. Se determină glicemia bazală. Apoi se administrează cantitatea de 75 g glucoză în maximum 5 minute și se determină din nou glicemia după 2 ore de la administrare.

Factori care pot influența testul:

- Dieta anterioară: trebuie să fie "normală" - 3-4 zile înainte (pacientul trebuie să consume minim 150 g glucide/zi).
- Perioada din zi: testul se face dimineața (între 7:30 și 10:00), deoarece glicemia este ceva mai mare în cursul amiezii.
- medicație: diureticele tiazidice, β -blocantele, fenitoinul sau steroizii (sunt de evitat în dimineața testului).
- Activitatea fizică: se recomandă un nivel obișnuit al activității fizice cu 24 ore înaintea testului și evitarea efortului fizic înaintea (dimineața) și în timpul testului.

Estimarea glicemiei

Numeroși factori pot influența valoarea glicemiei. Factorii care interferează cu dozarea glicemiei ar fi valorile crescute ale bilirubinei, hemoglobinei, acidului uric și creatininei (rezultate glicemiei pot fi fals ridicate).

Există diferențe între sângele venos și capilar (glicemia este mai mare în sânge capilar), în sânge este mai mică decât în plasmă (datorită faptului că volumul de distribuție al glucozei în sânge este mai mare din cauza hematiilor).

Separarea sângelui de plasmă trebuie să se facă rapid, sau trebuie folosit un anticoagulant care blochează glicoliza în hematii (NaF).

15.4.4 MONITORIZARE BIOCHIMICĂ

Glucozuria a fost utilă în trecut pentru auto-monitorizare, însă în prezent nu mai este folosită în acest scop. Glucoza apare în urină de obicei la valori ale glicemiei de peste 180 mg/dL (acesta fiind considerat pragul renal de reabsorbție a glucozei). Glicozurie semnificativă este cantitatea mai mare de 100 mg de glucoză eliminată prin urină în 24 ore.

Determinarea glicemiei cu glucometrul individual este preferată și accesibilă în prezent, fiind metoda ideală pentru auto-monitorizare. Glucometrele utilizând testele de chimie uscată sunt extrem de utile datorită posibilității de monitorizare a glicemiei pe parcursul întregii zile, în funcție de modificarea dietei, a nivelului de activitate fizică, de apariția unor patologii noi, ceea ce permite decelarea hipoglicemiilor și hiperglicemiilor în timp util.

HbA1c (hemoglobina glicozilată) este testul care permite monitorizarea controlului glicemic pe o perioadă mai lungă de timp. Glicozilarea proteinelor (în acest caz a hemoglobinei)

este un proces care are loc în sânge proporțional cu valoarea glicemiei. În cadrul procesului de glicozilare glucoza se atașează neenzimatic la capătul amino-terminal (al valinei terminale) din lanțul β al moleculei de hemoglobină, se formează o bază Schiff, care în etapa următoare se transformă în compus Amadori stabil. Hemoglobina este preferată altor proteine pentru că are un timp de înjumătățire lung (~60 zile), în timp ce albumina spre exemplu are timpul de înjumătățire de 20 zile.

Tipuri de Hb: HbA0 este hemoglobina normală preponderentă a adultului, cu formula $\alpha_2\beta_2$; HbA1 este fracțiunea glicozilată totală, din care 80% este HbA1c, iar restul se formează prin glicozilarea altor resturi aminice din structura lanțului globinic, decât cea a valinei N-terminale a lanțului β ; HbA2 este compusă din lanțurile $\alpha_2\delta_2$, respectiv hemoglobina fetală (HbF) are structura $\alpha_2\gamma_2$.

În mod normal maximum 5% din hemoglobină este glicozilată. HbA1c este un parametru foarte util datorită timpului de înjumătățire lung al hemoglobinei, astfel poate da informații asupra controlului glicemiei pentru o perioadă anterioară mai lungă de timp, spre deosebire de valoarea glicemiei, care reflectă doar situația din momentul recoltării. Valori între 5,7-6,4 % indică prediabetul / risc crescut de diabet, iar valori peste 6,5 % stabilesc (după confirmare) diagnosticul de diabet. Valori ale HbA1c sub 7% la subiecții cu diabet, arată un control bun al glicemiei.

Concentrația **insulinei** bazale se situează în mod normal între 5-25 uU/ml. Valoarea acesteia poate fi crescută în fazele inițiale ale tipul 2 de diabet (în perioada de hiperinsulinism compensator), dar ulterior scade progresiv pe măsura diminuării capacității secretorii β celulare.

Concentrația **peptidului C** bazal (0,4-2 ng/ml; 0,3-1,5 nM/L), este un indicator mai bun pentru producția endogenă de insulină (mai ales în cazurile cu anticorpi anti-insulină, care blochează hormonul sau pentru pacienții insulino-tratați).

15.4.5 HIPERLIPOPROTEINEMIILE LA PERSOANELE CU DIABET

Apar de obicei dislipidemii mixte, cu creșterea trigliceridelor și ale colesterolului seric (total și fracțiunea LDL-colesterol). Cauzele acesteia sunt:

- lipoliza accentuată în țesutul adipos duce la creșterea nivelului acizilor grași liberi, se intensifică sinteza hepatică a trigliceridelor, care apoi sunt înglobate în particulele VLDL;
- scăderea activității lipoprotein lipazei (insulina fiind un activator al LPL).

La persoanele cu diabet zaharat de tip 1 poate crește fracțiunea HDL-colesterolului, totuși nu protejează împotriva aterosclerozei (datorită apoproteinelor glicozilate, rapid epurate), deoarece scade subclasa HDL3 (protectoare). În diabetul zaharat de tip 2 scade HDL-colesterolul.

15.4.6 COMPLICAȚIILE DIABETULUI

Complicațiile cronice ale diabetului zaharat (care, în cazul DZ tip 2 pot fi prezente chiar la momentul diagnosticului) sunt:

a. Complicații microangiopatice:

- retinopatia diabetică, care poate evolua până la cecitate; apar microanevrisme, exudate dure și moi, hemoragii retiniene și vitreene, neovase, respectiv hemoragii, exudate și edem macular;
- nefropatia diabetică, în care apare progresiv micro- și macroalbuminuria. Progresia leziunilor specifice la nivel renal (glomeruloscleroză: membrane bazale îngroșate și deformate, acumulare de material membranoid în axele mezangiale, *noduli amiloizi* voluminoși, care strivesc și deformează lumenul capilarelor glomerulare) poate duce în timp la instalarea insuficienței renale;
- neuropatia diabetică, care se caracterizează prin alterarea sensibilității tactile, termice, vibratorii și dureroase și/sau a reflexelor osteotendinoase în special la nivelul membrelor inferioare, dar și superioare (polineuropatie periferică senzitivo-motorii). Neuropatia se poate instala și la nivelul sistemului nervos vegetativ conducând la modificări cardiovasculare, gastrointestinale, urogenitale sau cutanate.

b. Complicații macroangiopatice: boala ischemică coronariană, angiopatia diabetică periferică sau boala cerebrovasculară.

c. Altele: modificări dermatologice (necrobioză lipoidică, dermatopatia diabetică etc), modificări muscolotendinoase și osteoraticulare (sindromul tunelului carpian, boala Dupuytren), modificări oculare (cataractă, miopie), infecții (de pildă vaginita cu *Candida albicans*, furunculoză sau alte stafilococii cutanate).

Complicațiile acute ale diabetului zaharat sunt hipoglicemia, cetoacidoza diabetică, coma hiperosmolară noncetonică (rar) și acidoza lactică (foarte rar).

15.4.6.1 Cetoacidoza diabetică (CAD)

CAD este o complicație metabolică acută și severă a diabetului zaharat, în trecut responsabilă pentru 70% din decesele bolnavilor diabetici.

CAD apare pe fondul unui deficit (sever) de insulină, iar anumite situații care cresc necesarul de insulină (stres acut, infecții, alte afecțiuni majore), pot declanșa instalarea CAD, deoarece cresc eliberarea hormonilor contrareglatori/ hiperglicemianți. Întreruperea tratamentului sau inadaptarea dozelelor de insulină chiar în timpul acestor episoade trebuie evitată, și de aceea este foarte importantă educația specifică a pacienților cu diabet.

Sub acțiunea intensificată a hormonilor hiperglicemianți, crește rata glicogenolizei și gluconeogenezei, cu eliberarea unor cantități mai mari de glucoză la nivel hepatic. Astfel crește glicemia, preluarea țesuturilor mari consumatoare (hepatic, adipos) fiind mai mică (datorită nivelului scăzut al insulinei). Hiperglicemia se datorează în primul rând eliberării crescute și neosintezei hepatice de glucoză și abia apoi preluării scăzute a glucozei în țesuturile insulino-dependente. Crește osmolaritatea plasmei, ceea ce provoacă deshidratare celulară și sete. Glucozuria provoacă poliurie prin diureză osmotică și interferează cu reabsorbția tubulară a Na^+ , H_2O , K^+ . Se intensifică lipoliza datorită deficitului de insulină, crește nivelul acizilor grași liberi,

care iau parte la procesul de β -oxidare hepatică. Din excesul de acetyl-CoA eliberat se formează corpi cetonici, care duc la acidoză metabolică. Crește concentrația protonilor, care intră în celule în schimbul ionilor de K^+ : apare o hiperpotasemie temporară, după care excesul se elimină pe cale urinară (Figura 15.18). Creșterea concentrației protonilor (scăderea pH-ului), care traversează bariera hematoencefalică, provoacă hiperventilație (respirație Küssmaul).

Caracteristici clinice:

- bolnav semiconștient, cu respirație Küssmaul și miros de acetonă;
- poliurie, polidipsie;
- oboseală;
- vomă, greață;
- deshidratare, hipotensiune, tahicardie;
- tegumente și mucoase uscate;
- eventual istoric recent de infecție.

Investigații: glicemie, uree, ionograma (potasemie), corpi cetonici (acidul acetoacetic reacționează cu nitroprusiatul de sodiu, dar nu se poate detecta astfel acidul β hidroxibutiric, care se formează în fazele inițiale ale bolii), parametri echilibrului acido-bazic, fosfatul anorganic.

Tratament:

- lichide izotone;
- insulină bolus inițial 0,15 U/kgc, apoi 0,1 U/kgc/oră (doza trebuie adaptată ulterior);

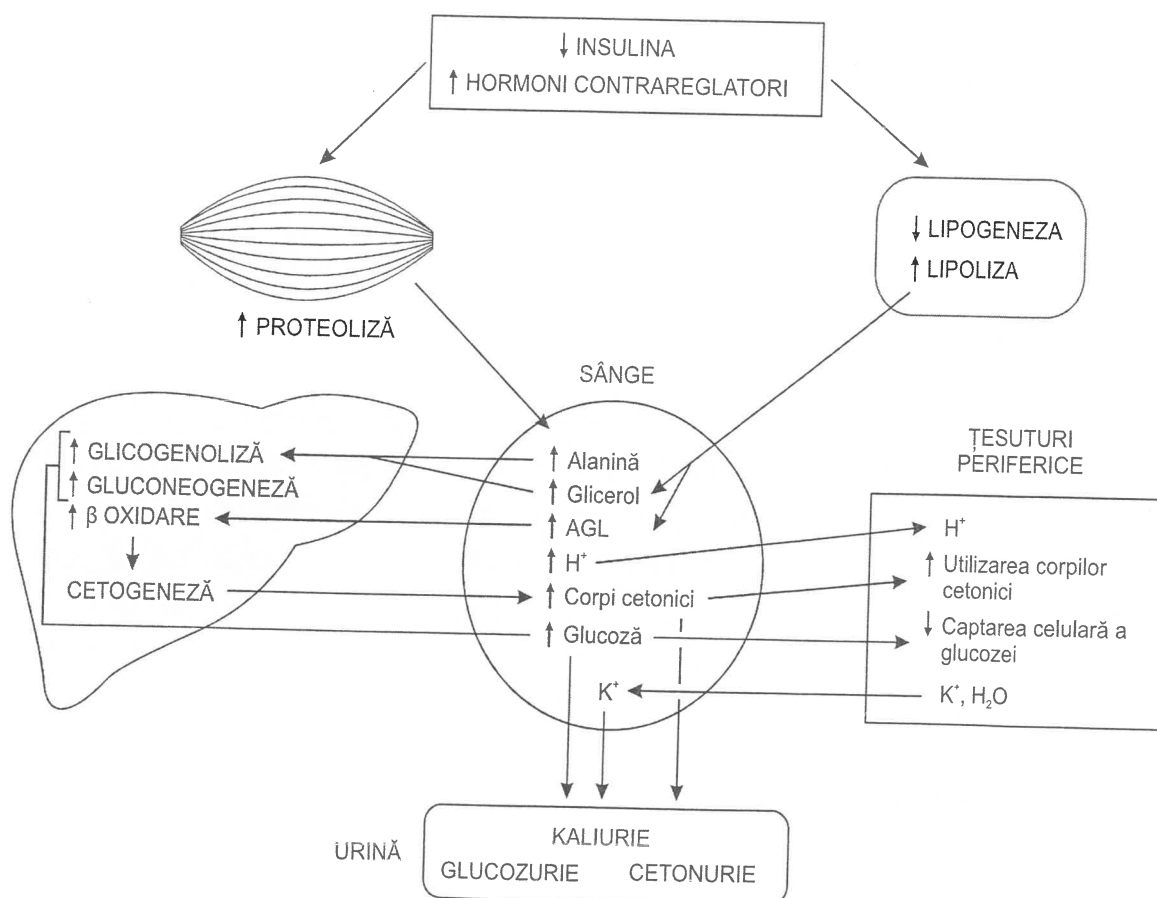


Figura 15.18 Dezechilibrul metabolic din coma acido-cetozică

- suplimentarea K^+ , în funcție de concentrația acestui ion;
- uneori administrare de bicarbonat (HCO_3^-), în funcție de BE.

15.4.6.2 Coma hiperosmolară

Raționamentul pentru care unii pacienți fac comă cetoacidotică, iar alții comă hiperosmolară nu este pe deplin cunoscut.

Diferențe majore față de coma cetoacidotică:

- osmolaritatea serică este foarte crescută: > 330 mOsm/kg;
- glicemia este peste 600 mg/dL;
- persoanele în cauză sunt de obicei vârstnici cu DZ tip 2.

Caracteristici clinice:

- sete intensă, polidipsie, poliurie masivă;
- deshidratarea este semnul major, evidentă la nivelul tegumentelor și mucoaselor;
- datorită hipovolemiei, se constată hipotensiune ortostatică și puls slab, tahicardic;
- alterarea progresivă a stării de conștiență.

Investigații:

- glicemia este foarte crescută (peste 600 mg/dL);
- pH-ul este normal sau aproape de normal;
- bicarbonatul seric este peste 15 mEq/L
- osmolaritatea crescută (peste 320 mOsm/L): $mOsm/L = 2([Na^+] + [K^+]) + [G]/18 + [Ureea]/6$.
- absența cetonemiei

Tratament:

- lichide izo/hipotone (NaCl 0,9%, sau 0,45% dacă osmolaritatea este peste 350 mOsm/ml);
- insulină: 0,15 U/kgc, apoi 0,1 U/kgc/oră;
- potasiu intravenos (în funcție de concentrația serică a potasiului).

15.5 PREZENTĂRI DE CAZ

15.5.1 DIABET ZAHARAT TIP 1 – DEBUT CU CETOACIDOZĂ

Un tânăr de 17 ani se adresează medicului de familie datorită scăderii în greutate, senzației de oboseală, polidipsiei și poliuriei constatate în ultimele săptămâni. Examenul fizico-chimic al urinei a evidențiat o glucozurie de 2 g/L. Medicul îi recomandă să se adreseze serviciului de diabetologie. A doua zi, familia îl anunță pe medicul de familie că tânărul se simte rău, a prezentat vărsături repetate și nu a părăsit locuința. În urma vizitei la domiciliu medicul face o programare de urgență la secția de diabet a spitalului, deoarece în urma examinării pacientului constată hipotensiune, tahicardie, extremități reci, transpirație abundentă și respirație acetonemică. În serviciul de urgență, examinările de laborator au oferit următoarele rezultate:

- Glucoză: 540 mg/dL
- Uree: 100 mg/dL

- Creatinină: 1,6 mg/dL
- Sodiu: 129 mmol/L
- Potasiu: 5,9 mmol/L
- pH: 7,04
- Bicarbonat: 6 mmol/L
- pCO_2 : 20 mmHg

Comentariu

Aspectul clinic și paraclinic indică o cetoacidoză diabetică tipică: pacientul are un exces de protoni semnificativ (91 nM/L), cu compensare respiratorie parțială; hipotensiunea, tahicardia, transpirația și hiponatremia sugerează o depleție de fluide severă în spațiul extracelular; hiperpotasemia se datorează pe de o parte redistribuției între spațiile intra-extracelular, pe de altă parte – scăderii eliminării renale, urmare a dehidratării severe (confirmată și de creșterea neproportională a concentrațiilor creatininei și ureei, a celei din urmă și datorită metabolizării excesive a aminoacizilor). Pacientul este hiperglicemic, iar prezența corpurilor cetonice în urină poate fi confirmată de examenul fizico-chimic al acesteia.

15.5.2 COMĂ HIPEROSMOLARĂ LA O PACIENTĂ CU DIABET ZAHARAT TIP 2

O femeie de 69 de ani cu diabet zaharat tip 2 care locuiește singură, a fost găsită de fiul ei acasă, în stare de semiconștiență. Consultul efectuat la serviciul de urgență a evidențiat o pacientă dehidratată, oligurică, cu următoarele rezultate de laborator:

- Glucoză: 900 mg/dL
- Uree: 210 mg/dL
- Creatinină: 1,7 mg/dL
- Sodiu: 148 mmol/L
- Potasiu: 4,6 mmol/L
- Proteine totale: 89 g/L
- pH: 7,34
- Bicarbonat: 22 mmol/L
- pCO_2 : 42 mmHg

Examenul fizico-chimic al urinei nu s-a putut efectua la momentul primului consult, datorită faptului că nu s-a putut recolta urină.

Comentariu

Osmolaritatea plasmei este crescută datorită hiperglicemiei severe, care determină o diureză osmotică accentuată. Pierderea însemnată de lichide pe cale renală a condus la dehidratarea pacientei; scăderea filtrării glomerulare (urmare a scăderii volumului circulant) a condus la retenție azotată și creșterea concentrației proteinelor și sodiului în plasmă. Parametrii echilibrului acido-bazic nu sunt modificați semnificativ; ușoara scădere a bicarbonaților se poate datora filtrării renale reduse. După o oră de la admiterea în spital a pacientei și administrarea parenterală de lichide și insulină, examenul de urină efectuat nu a evidențiat corpi cetonici, deși glucozuria a fost peste 4 g/L.

Hiperglicemia severă non-cetonemică apare doar în diabetul tip 2; substratul este acela că pentru prevenirea unei lipolize excesive este suficientă o cantitate minimă de insulină (pentru a contracara efectul cetogenetic al glucagonului), mult mai mică decât aceea necesară pentru pătrunderea glucozei în celula musculară și adiposă.

15.5.3 DIABET ZAHARAT ECHILIBRAT, CU HIPERGLICEMIE SEVERĂ TRANZITORIE

O tânără cu diabet zaharat tip 1, cunoscută și tratată de 2 ani, se prezintă în serviciul ambulator pentru controlul periodic, fără să relateze nimic semnificativ clinic de la ultima vizită. Nu și-a autoverificat în ultima săptămână glicemia, datorită faptului că îi displace să se înțepe pentru determinarea acesteia din sângele capilar. Investigațiile efectuate cu ocazia consultului au dat următoarele rezultate:

- Glicemia (la 2 ore după micul dejun): 300 mg/dL
- Glucozurie: 10 g/L
- HbA1c: 6,8%

Comentariu

În ciuda hiperglicemiei și a glucozuriei severe (însoțite aparent de un dezinteres în monitorizarea bolii), controlul glicemic de lungă durată este bun. La o anamneză mai amănunțită, pacienta relatează că a participat în noaptea precedentă la o petrecere cu prietenii, la care a consumat mai multe alimente decât de obicei.

15.5.4 SINDROM VON GIERKE

Un copil de sex masculin de opt luni se internează în secția de pediatrie cu stare generală alterată, letargic, cu transpirație rece, prezentând perioade de iritabilitate, care se remit după administrarea de alimente. La examenul fizic se decelează un abdomen voluminos, datorită măririi în volum a ficatului. Determinarea glicemiei matinale a evidențiat o valoare de 41 mg/dL, copilul prezentând transpirație, tahicardie, iritabilitate, corectate după alimentarea copilului. Glicemia la o oră după masă a fost 69 mg/dL. Ecografia hepatică a arătat o structură densă a parenchimului, iar în urma biopsiei hepatice, examenul morfopatologic a evidențiat depozite însemnate de glicogen în citosolul hepatocitelor.

Comentariu

Copilul are un deficit sever de eliberare a glucozei din depozitele de glicogen hepatice. Severitatea hipoglicemiei se datorează cel mai probabil deficitului de G-6-fosfatază (necesară pentru eliberarea glucozei din hepatocit, fie că G-6-P provine din glicogenoliză, fie din gluconeogeneză). Testele de biologie moleculară au confirmat o deficiență de tip Ia (80% dintre cazurile de glicogenoză von Gierke se datorează deficitului de G-6-P Hidrolază, restul – tipul Ib – deficitului de transportor de G-6-P). Remediul terapeutic constă în mese ușoare, dar frecvente cu carbohidrați complecși cu absorbție lentă din tubul digestiv; la copilul mic, alimentația pe parcursul nopții este de asemenea importantă.

15.5.5 NOU-NĂSCUT MACROSOM CU MAMĂ DIABETICĂ

În urma unei sarcini cu un control precar al glicemiei la o femeie cu diabet, se naște un copil de sex masculin cu greutatea de 5,1 kg. La scurt timp după naștere, copilul prezintă semne de hipoglicemie severă (este iritabil, cu transpirații reci, tahicardic), corectate prin administrare de soluție de glucoză.

Comentariu

Copilul a venit în contact cu un mediu hiperglicemic în viața intrauterină; organismul fătului s-a adaptat prin producerea excesivă de insulină, care are și un efect similar cu al hormonului de creștere (producând macrosomia). Hiperinsulinemia la momentul nașterii, a promovat captarea glucozei și depunerea acesteia sub forma de depozite de glicogen hepatice și musculare cu sistarea gluconeogenezei. Hipoglicemia acută se corectează prin administrarea de glucoză, în zilele următoare însă, acest lucru nu mai este necesar, depozitele de glicogen și mai ales masa musculară consistentă, furnizând materia primă pentru susținerea glicemiei.

Bibliografie recomandată

1. Baynes J.W., Dominiczak M. – Medical Biochemistry, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005, p.143-187, p.273-297.
2. Burtis C.A., Ashwood E.R. - Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.
3. Devlin T. – Textbook of Biochemistry, Ed.3, Wiley- Liss, 1992, p.237-358.
4. Howanitz J., Howanitz P. – Laboratory Medicine, Churchill Livingstone, 1991, p.127-142.
5. Laker M.F. – Clinical Biochemistry for Medical Students, W.B.Saunders Company, 1996, p.1-21.
6. Marshall W., Bangert S. – Clinical Chemistry, Ed.5, Mosby, 2004, p.191-217.
7. Marshall W., Bangert S., Lapsley M. – Clinical Chemistry, Ed.7, Mosby, 2012, p. 181-206.
8. Marshall W., Lapsley M., Day A.P., Ayling R. – Clinical Biochemistry – Metabolic and Clinical Aspects, Ed. 3, ELSEVIER, 2014, p.273-348.
9. Mayne P.D. – Clinical Chemistry in diagnosis and treatment, Ed 6., Arnold, 1994, p 195-222.
10. Nelson D., Cox M. – Lehninger Principles of Biochemistry, Ed. 4, W.H. Freeman and Company, 2005, p. 293-321.
11. Pagana Kathleen, Pagana T. - Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests, Ed.3, Mosby ELSEVIER, 2006, p. 222-223, p.267-284.
12. Smith Colleen, Marks A., Lieberman M.–Marks' Basic Medical Biochemistry – A Clinical Approach, Ed.2, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, p. 3-38, p.477–541.
13. Ionescu-Târgoviște C, Botea V. Diabetul zaharat: definiție și clasificare. în Tratat român de boli metabolice. Șerban V (ed.). Ed Brumar; 2010; vol.1, pg: 69-76.
14. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care. 2015; 38 Supl 1: S 08-16.
15. Ionescu-Târgoviște C, Lichiardopol R, Guja C. Etiopatogenia diabetului zaharat. în Diabetul zaharat. manual pentru studenți, medici de familie și rezidenți. ed. Ionescu-Târgoviște C, Lichiardopol R, Guja C. Editura Ilex, 2007, pg: 20-57.

16. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, et al. HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008; 358: 1991–2002.
17. Bala C, Coca M. Metode de investigație în nutriție și bolile metabolice. În *Diabetul zaharat, nutriția și bolile metabolice*. Ed. Hâncu N, Roman G, Vereșiu IA. Editura Echinox, 2010, vol. 1, pg 97-151.

16

Metabolismul lipidelor/ lipoproteinelor și ateroscleroza

Minodora Dobreanu

16.1 LIPIDELE

Lipidele sunt un grup heterogen de compuși chimici, insolubili în apă, dar solubili în solvenți organici apolari (cloroform, tetraclorură de carbon benzen), cu rol energetic (TG, AGL), structural (fosfolipidele) sau funcțional (acizi biliari, hormoni steroizi, prostaglandine/ leucotriene etc).

Lipidele sunt combinații ale acizilor grași (AG) cu alcooli sau amine. Ele reprezintă 15-20% din masa corporală a unui adult normal conformat. Grupa mare a lipidelor cuprinde două categorii mari de substanțe: lipidele simple și lipidele compuse.

Lipidele simple, din punct de vedere chimic, sunt esterii unor alcooli mono- sau polivalenți formați cu acizi grași lungi catenari (saturați sau nesaturați) cu un număr par de atomi de carbon. Prototipul lor îl constituie trigliceridele (grăsimile neutre), în care un alcool trivalent (triol: glicerol) este esterificat cu 3 molecule de acizi grași.

Lipidele compuse conțin în afara glicerolului și alți alcooli: inozitol (în inozitolfosfatide) sau sfingozină (în sfingomieline), dar și fosfați (în fosfolipide) și glucide (în cerebrozide și ganglioizide). Grupa steroizilor cuprinde colesterolul și derivații săi (acizii biliari, hormonii steroizi și sexuali), reprezentanți importanți ai biostructurilor purtătoare de semnale biologice (hormoni).

8.1.1 LIPIDELE SERICE

Concentrația totală este de 8-12 g/l. **Clasele** majore de lipide serice sunt următoarele:

a. Colesterolul - alcool policiclic (conține 27 atomi de carbon, greutate moleculară 386 D), având ca structură de bază nucleul steranic, cu o grupare -OH la C3 și o catenă ramificată, apolară, la C17 – este un component important al membranelor celulare, al substanței nervoase, precursorul acizilor biliari, hormonilor steroizi, vitaminei D etc. La nivelul membranelor celulare formează împreună cu sfingomielina, caveole – invaginații ale membranei în care se concentrează moleculele semnal. Menținerea constantă a concentrației colesterolului membranar este esențială pentru buna funcționare a moleculelor semnal și se realizează printr-un sistem reglator alcătuit din factori de transcriere membranari (SREBPs) - modulatori ai transcrierii unor gene care codifică proteine esențiale în metabolismul colesterolului (LDL R, HMG-CoA sintaza și HMG-CoA reductaza).

Nivelul fiziologic în ser este de 120 - 200 mg/dL (3 - 5,17 mM), din care 2/3 este esterificat (CE - intens hidrofoab), iar 1/3 liber (CL - slab hidrofil); colesterolul plasmatic este de origine alimentară (aproximativ 0,3-0,5g/zi) și endogenă (aproximativ 1g/zi), fiind transportat mai ales în LDL. Metabolismul colesterolului este important în etiopatologia bolilor cardiovasculare și în patologia hepato- biliară.

b. Trigliceridele (TG) sunt structuri puternic hidrofoabe - triesteri ai glicerolului cu acizi grași. Au rol în stocarea și transportul energiei într-o formă eficientă, fără apă și cu putere calorică ridicată: dacă aceeași cantitate de energie stocată în țesutul adipos al unui adult de 70 kg ar fi stocată sub formă de glicogen, organismul ar cântări 210 kg. Acizii grași din TG țesutului adipos sunt eliberați de lipaza hormon sensibilă (activată de glucagon, adrenalina și inhibată de insulină). Concentrația lor serică este de 100 - 200 mg/dL (1,1 - 2,2 mM). La un individ adult cu o dietă medie, sunt transportate în plasmă, zilnic, 100-150 g TG, din care 70-100 g provin din alimentație (TG exogene, transportate în chilomicroni) și 30-60 g din sinteza endogenă/hepatică (TG endogene, transportate în VLDL). În cazuri patologice, TG se acumulează în ficat, conducând la steatoză hepatică.

c. Fosfolipidele sunt substanțe amfipatice (au o moleculă bipolară), esteri ai acidului fosfatidic cu aminoalcooli, aminoacizi alcooli ciclici. Sunt componentele principale ale membranelor celulare (dublu strat fosfolipidic cu proteine înglobate) și ale lipoproteinelor (participă la solubilizarea lipidelor apolare în ser), mesageri secundari (fosfatidilinozitol 4,5-difosfat) în transmiterea informațiilor din mediul extern celular la efectorii intracelulari, markeri de suprafață celulară (glicolipide), promotori ai procesului de coagulare (Factor plachetar 3, Factorul tisular – factorul III al coagulării, în denumirea anterioară), catalizatori ai digestiei și absorbției intestinale a lipidelor etc. Concentrația plasmatică este de 150-350 mg/dL, originea lor fiind alimentară sau endogenă.

d. Acizii grași intră în compoziția trigliceridelor și fosfolipidelor; sunt de fapt componenții care înmagazinează energia în legăturile covalente dintre atomii de carbon constituenți. Acidul arahidonic (un acid gras polinesaturat cu 20 atomi de carbon) este precursorul prostaglandinelor, leucotrienelor și tromboxanilor. Acizii grași sunt de fapt acizi carboxilici cu catenă lineară și număr par de atomi de carbon, saturați sau nesaturați. Acizii grași pot fi cu lanț scurt (C2-6), lanț mediu (C8-12) - caracteristici pentru bacterii, și lanț lung (C14-24) - aceștia se găsesc mai ales în structuri aparținând organismelor superioare. Numerotarea atomilor de carbon din molecula acizilor grași începe de la carbonul grupării carboxilice cu cifre arabe (1, 2, 3, ...), sau de la carbonul vecin acestuia dacă se utilizează alfabetul grecesc (α , β , γ , ...), ultimul atom de carbon fiind notat cu w. După numărul atomilor de carbon se scrie numărul dublelor legături, cele două cifre fiind separate cu două puncte (de ex. C20:4). Acizii grași nesaturați (polinesaturați) prezintă legături duble conjugate începând de la al treilea carbon dinspre capătul w (de ex. C20:5 - eicosapentanoic acid).

Exemple de acizi grași prezenți în organism: saturați - acidul palmitic (C16:0), acidul stearic (C18:0); nesaturați - acidul oleic (C18:1), acidul linoleic (C18:2), acidul linolenic (C18:3), acidul arahidonic (C20:4), acidul eicosapentanoic (AEP - C20:5), acidul docosahexanoic (ADH - C22:6). Cele două clase de AG polinesaturați esențiali sunt acizii omega-3 și respectiv

omega-6. Se formează în organism prin procese de elongare și desaturare, pornind de la precursori esențiali pentru organismul uman, sursa lor fiind exogenă: acidul α -linolenic (C18:3, w-3) pentru clasa w-3 și respectiv acidul linoleic (C 18:2, w-6) pentru clasa w-6. Acidul linoleic și acidul α -linolenic sunt AG esențiali, a căror sinteză este posibilă la nivelul celulelor vegetale. La nivelul organismului animal și uman sinteza este imposibilă datorită lipsei enzimelor care inseră legătura dublă în poziția omega-3 sau omega-6. Acidul linoleic, AG cu 18 atomi de carbon, precursorul clasei w-6, are prima legătură dublă la nivelul atomului de carbon numărul șase pornind de la capătul metil terminal (capătul omega), fiind astfel denumit AG w-6. Poate fi elongat și desaturat în organismul uman și al unor animale pentru a forma acidul arahidonic (C20:4, w-6); acesta este sursa eicosanoizilor w-6, care se formează prin oxidarea mediată de ciclooxigenază, lipooxigenază și epoxigenază pentru a forma prostaglandine, leucotriene, lipoxine și compuși P-450 - importanți mesageri chimici.

În citoplasma celulelor plantelor verzi (mai ales în alge și fitoplancton), acidul linoleic poate fi desaturat în poziția w-3 pentru a forma acidul α -linolenic, AG cu 18 atomi de carbon, precursorul clasei w-3. Aceleași enzime care transformă acidul linoleic, pot elonga și desatura acidul α -linolenic pentru a forma analogul acidului arahidonic: acidul eicosapentanoic (C20:5, w-3); acesta va intra în competiție cu acidul arahidonic pentru aceleași ciclooxigenază, lipooxigenază și epoxigenază, care generează clase diferite de eicosanoizi, care se pot opune sau contracarează efectele eicosanoizilor w-6. Elongazele și desaturazele au mai multă afinitate pentru AG mai nesaturați (clasa w-3). Cu toate acestea AG supuși cel mai frecvent proceselor de elongare și desaturare sunt precursorii seriei w-6, care se găsesc în majoritatea dietelor actuale în cantitate mare. În general eicosanoizii derivați din acidul arahidonic au caracter proinflamator și agregant, în timp ce derivații acidului eicosapentanoic sunt antiinflamatori și inhibă agregarea plachetară. Balanța dintre cele două clase de eicosanoizi diferă în țesuturile umane reflectând diversele obiceiuri alimentare. Astfel, datorită naturii competitivității și a proprietăților biologice, este importantă menținerea echilibrului între AG ai claselor w-6 și w-3 în dietă. Dacă se consumă mult acid linoleic și puțin acid α -linolenic, calea prioritară de acțiune a enzimelor va fi w-6, cu inhibarea etapelor corespondente ale celeilalte serii.

Studiile utilizând izotopi stabili au arătat că elongarea și desaturarea acidului α -linolenic în organismul uman la AEP și ADH se realizează la nivelul plasmei și elementelor figurate sanguine. Aceste procese de conversie sunt însă lente și limitate la om.

Acizii grași liberi (AGL) plasmatici, sunt molecule amfipatice, material energetic pentru țesuturile consumatoare, mai ales pentru fibra miocardică. Puține celule nu au capacitatea de a utiliza AGL ca substrat energetic (hematia, neuronul). Doar o cantitate foarte mică din AG circulanți (aproximativ 1%) se găsesc în LP plasmatiche, majoritatea fiind fixați prin forțe fizice pe albumină, care are pe suprafața ei 10 locusuri de fixare nespecifice. Concentrația AGL în plasmă este foarte scăzută (15-30 mg/dL) - au un timp de înjumătățire scurt (3-5 minute), fiind rapid preluați de celulele consumatoare.

e. Eicosanoizii (vezi și 18.3.5) sunt un grup de substanțe derivate din acidul eicosanoic (C₂₀), cu rol important în răspunsul imun, hemostază/ tromboză, funcționarea musculaturii

netede, reproducere, metabolismul colesterolului. Denumirea principalilor reprezentanți (prostaglandine, tromboxani și leucotriene) derivă de la numele primelor țesuturi în care au fost identificați (respectiv prostata, trombocitele și leucocitele). Principalul precursor al acestora este acidul arahidonic (C20:4, acidul eicosatetraenoic), eliberat din membranele celulare de fosfolipaza A2. Sub acțiunea a două enzime distincte (Ciclooxygenaza și Lipoxygenaza) se formează intermediarii comuni (PGG₂ și PGH₂ - prostaglandinele G₂ și H₂, respectiv 5-HPETE, 5-hidroperoxi-eicosatetraenoic acid), din care rezultă apoi reprezentanții cu funcții specifice / distincte (Figura 16.1).

Acțiunea corticoizilor, antiinflamatoarelor nesteroidice și a aspirinei se bazează în bună măsură, pe blocarea unor enzime în căile de sinteză ale acestor substanțe (Figura 16.2).

16.1.2 PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ȘI BIOLOGICE ALE LIPIDELOR

Catenele alifaticale ale acizilor grași sunt apolare, insolubile în apă, la fel ca și trigliceridele și esterii de colesterol. Lipidele compuse dar și colesterolul liber (neesterificat), sunt însă substanțe amfipatice, având în moleculele lor atât porțiuni polare (fosfatice, aminice sau hidroxilice), cât și apolare (catene alifaticale, scheletul sterolic). Din acest motiv, pe o suprafață delimitantă între un mediu apos și lipidic, aceste lipide se orientează într-un fel ordonat bifazic: porțiunea lor polară se așează spre faza apoasă, cea apolară spre faza lipidică.

În mediu apos, lipidele compuse formează în mod spontan, prin autoasamblare liposomi - formațiuni sferice, al căror înveliș conține spre exterior porțiunea polară, iar spre interior porțiunea apolară a fosfolipidelor. În miezul bulelor este inclusă o parte a mediului apos,

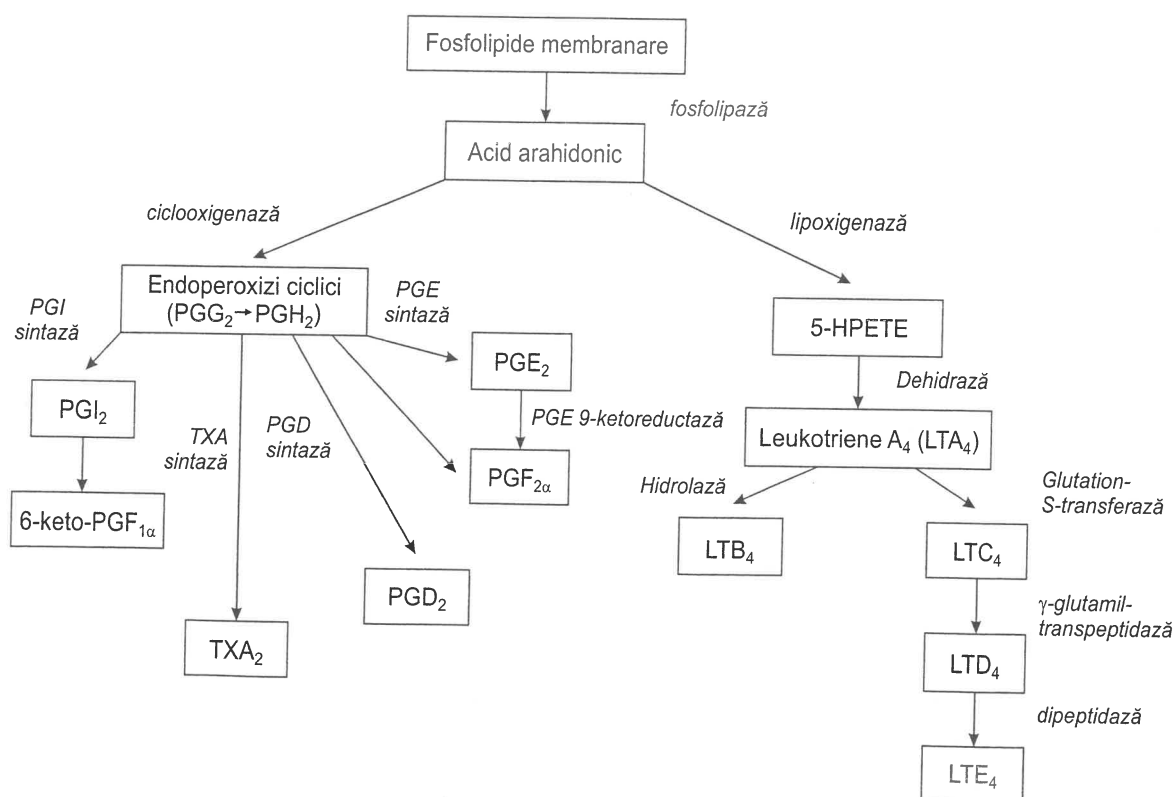


Figura 16.1 Căile de biosinteză ale prostaglandinelor și leucotrienelor

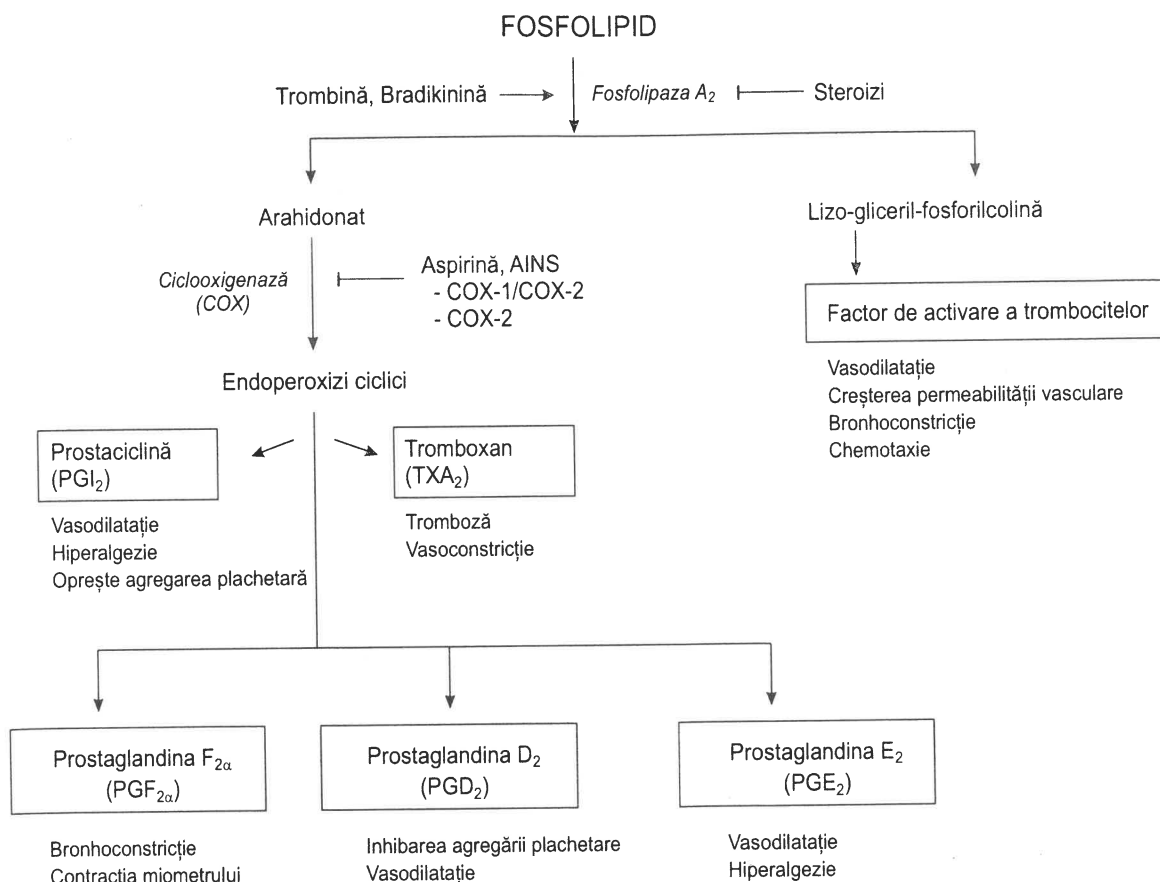


Figura 16.2 Principalele acțiuni biologice ale prostaglandinelor și căi de blocare a sintezei acestora

conținând substanțele dizolvate. Pe această cale pot fi introduse în celulele organismului, medicamente hidrosolubile, incluse în interiorul liposomilor. Printr-un mecanism oarecum similar se formează și lipoproteinele serice.

16.1.3 ROLUL BIOLOGIC AL LIPIDELOR

Rolul lor structural se manifestă prin participarea substanțială în alcătuirea diferitelor membrane biologice (membrana celulară, membranele organelor subcelulare). Prin insolubilitatea lor în apă, lipidele din membrane asigură impermeabilitatea acestora pentru substanțele polare dizolvate.

Lipidele au un important rol funcțional în alcătuirea diferitelor structuri receptoare de membrană, de afinitate mare și specificitate redusă (sfingolipide, inozitolfosfatide, diacilglicerol); în izolarea printr-un înveliș mielinic a axonilor neuronilor (sfingomieline, cerebrozide, ganglioizide); în exercitarea unor funcții biologice specifice (acizi grași esențiali, prostaglandine, prostaciline, tromboxani).

Funcționează ca izolator termic, localizat subcutanat și în jurul organelor externe.

Rolul energetic: „arderea” în organism a 1 g trigliceride furnizează 9,3 calorii, o cantitate mult superioară puterii calorice a glucidelor și proteinelor. Datorită acestui fapt, precum și datorită hidrofobiei grăsimilor neutre, se poate afirma că grăsimile neutre reprezintă mijlocul

ideal al depozitului energetic celular. Țesutul muscular striat periferic, precum și miocardul, își acoperă nevoile energetice cu precădere (într-o proporție de 80 %) prin oxidarea acizilor grași. În țesutul adipos brun al animalelor hibernante, acizii grași se oxidează cu eliberarea energiei sub formă de căldură. O decuplare similară a oxidării de fosforilare poate să se manifeste în mitocondrii și la organismele homeoterme, în caz de febră.

16.2 LIPOPROTEINELE

Plasma recoltată *a jeun* este clară, deși conține 800-1200 mg lipide/100 ml. Datorită caracterului prin excelență hidrofoab al lipidelor, în mediul apos plasmatic ele au nevoie de componente solubilizante / transportoare. Acizii grași circulă pe suprafața albuminei, nu același lucru se întâmplă însă cu trigliceridele – prea mari și prea hidrofobe pentru a fi transportate similar. Ele vor fi „împachetate” într-o manieră particulară, împreună cu colesterol, fosfolipide și proteine, formând lipoproteine (LP). Lipoproteinele sunt agregate macromoleculare complexe, solubile în apă, formate spontan prin autoasamblarea necovalentă a diverselor categorii de lipide cu proteine specifice (Apolipoproteine - ApoP). Au rolul de a transporta în mediul apos plasmatic, moleculele insolubile ale lipidelor (inclusiv vitamine liposolubile), de la locul de absorbție (intestinul subțire) sau sinteză (ficatul) la locurile de utilizare și stocare (țesuturile periferice). Rolul ApoP nu se rezumă însă la funcția de vehicul, ele servind și ca reglatori ai metabolismului lipidic: activează sau inhibă unele enzime (Lipoprotein lipaza - LPL, Lecitin-Colesterol-Acyltransferaza - LCAT) și intervin în procesul de recunoaștere la nivel celular al LP prin receptori. Între diverse clase de LP plasmatice au loc de asemenea, schimburi de ApoP și lipide, care facilitează metabolizarea LP.

16.2.1 STRUCTURA LIPOPROTEINELOR

S-au vehiculat mai multe teorii, actualmente fiind descrise două categorii structurale:

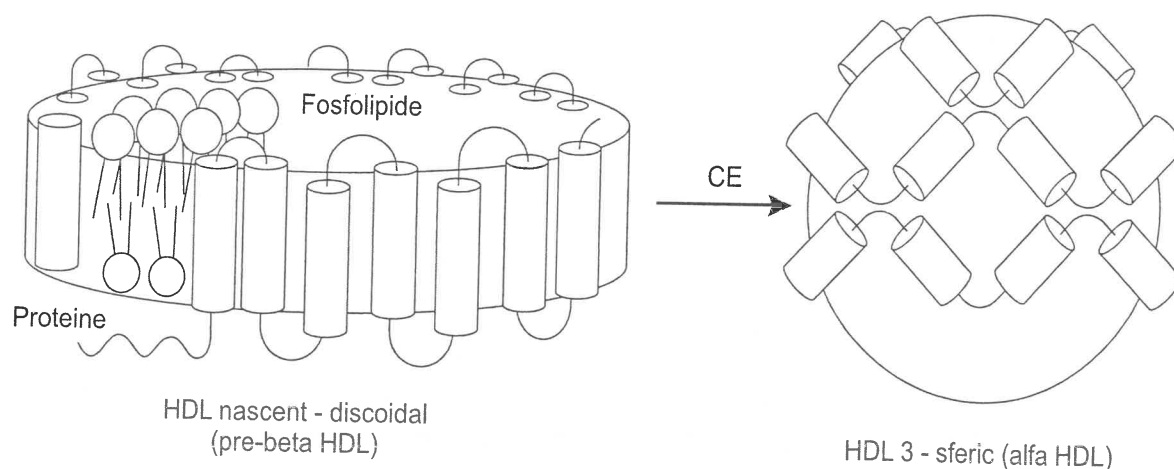
I. Lipoproteine - particule sferice, emulsionate sau microemulsionate, care conțin un miez lipidic apolar (TG, CE), învelit de o pătură de lipide polare (FL, CI) și apoproteine (*Figura 16.3 a, b*); în categoria emulsie sunt încadrate particule cu diametrul mai mare de 50 nm (Chilomicronii și LP cu densitate foarte mică - Ch și VLDL), iar în microemulsie - particulele mai mici de 50 nm (VLDL secundare, LP cu densitate intermediară - IDL-, cu densitate mică - LDL și cu densitate mare - HDL₂).

Clasele de LP diferă între ele prin proporția între miezul hidrofoab și suprafața hidrofilă (vezi clasificarea LP): în LP mari (Ch și VLDL), componentele hidrofile reprezintă doar o mică parte din masa totală a LP (2-10%), suprafața hidrofilă fiind imperfectă pe alocuri; în LP mici (HDL) dimpotrivă, învelișul hidrofil constituie majoritatea masei LP (60-75%).

II. Lipoproteine - particule discoidale, care nu conțin miez lipidic apolar, formate din lipide polare și apoproteine, cu o conformație bistratificată (HDL nascent - *Figura 16.4*): cele două straturi FL sunt așezate simetric, lanțurile acil ale acestora venind în contact, iar componenta polară fiind orientată spre mediul apos din jur; ApoP maschează bordura apolară a discului fosfolipidic; HDL au un rol special în controlul metabolismului ApoP, TG și în

Tabelul 16.I Apoproteinele plasmatice

ApoP	GM (kD)	Sinteză	Funcții
A-I	28	Intestin, Ficat	Proteină structurală a HDL, chilomicronilor, activator al LCAT
A-II	17,4	Intestin, Ficat	Proteină structurală a HDL, cofactor al LCAT și CETP, în concentrație mare - inhibitor al Lipazei hepatice (LH)
A-IV	44,5	Intestin	Efluxul colesterolului și transportul lui la ficat, activator LCAT
A-V	39	Ficat	Proteină structurală a VLDL, HDL, Ch, rol important în reglarea nivelului trigliceridelor plasmatice
B-100	514	Ficat	Proteină structurală a LDL, IDL, VLDL; ligand pentru receptorul LDL
B-48	241	Intestin	Esențială pentru sinteza și secreția Ch și VLDL
C-I	6,6	Ficat	Cofactor al LCAT în plasmă; transferată între HDL-VLDL
C-II	8,9	Ficat	Activator al LPL; în plasmă, este transferată între HDL – VLDL, chilomicroni
C-III	8,8	Ficat	Inactivator al LPL (inhibă clearance-ul Ch și VLDL), inhibă captarea hepatică a resturilor Ch și VLDL prin inhibarea interacțiunii Apo E cu LRP
D	24	Ficat	Prezent în structura HDL, participă la transferul CE între LP
E	34	Ficat, Creier, Rinichi	Proteină structurală a VLDL, Ch, resturile Ch, IDL și HDL; ligand pentru receptorii resturilor Ch și IDL, în hepatocite
F	30	?	Proteină structurală a HDL, inhibă CETP
G	75	?	Proteină structurală a VHDL1
H	50	?	Proteină structurală a Ch și VLDL, cofactor al LPL
J	70 – 90	Ficat, Creier, Ovar, Testicul	Transportul lipidelor, înnoirea membranelor, moartea celulară programată, reglarea sistemului complement
K	45	?	Transportul TG
M	26	?	Proteină din familia lipocalinelor, este implicată în transportul unor molecule lipofile; Potențează efectul antioxidant al HDL
(a)	200-800	Ficat	Factor independent de risc cardiovascular

**Figura 16.4 Structura lipoproteinelor cu densitate mare**

1. Apo-AI: sunt peptide pure, neconținând glucide, cu masa moleculară 28.000 D. Se formează în hepatocite și sunt cuprinse în moleculele HDL într-o proporție de 60-70% (din totalul Apo P), având un rol esențial în transportul invers al colesterolului. Gena codificatoare a apoA1 (*APOA1*), face parte dintr-un grup de gene poziționat pe brațul lung al cromozomului 11, care mai conține *APOC3*, *APOA4* și *APOA5*.
2. Apo-AII: sunt dipeptide cu masa moleculară de 36.000 D și cu cei doi componenți cuplați prin punți disulfidice (-S-S-). Sunt prezente în particulele HDL într-o proporție de 20-30%.
3. Apo-B: sunt glicoproteine cu masa moleculară mare. Apo B100 (514.000 D), formează partea proteică caracteristică a LDL; în cantități reduse se găsesc și în VLDL precum și în chilomicroni. Se fixează în mod specific pe receptorii LDL ai fibroblaștilor și adipocitelor, prin care face posibilă pătrunderea colesterolului, dar și a grăsimilor neutre, în aceste celule.
4. Apo-B 48: este 48% din porțiunea N terminală a Apo B100, sintetizată în enterocite și cu rol esențial în absorbția chilomicronilor.
5. Apo(a): este o apolipoproteină macromoleculară și polimorfă (are multiple izoforme cu greutatea moleculară în intervalul 200-800 kD) care se asociază cu Apo-B100 în structura LDL, formând Lp(a). Apo(a) prezintă omologii structurale marcate cu molecula plasminogenului. Din această cauză ea poate adera la resturi de lizină din proteinele membranelor celulare și astfel poate introduce LDL în celule și fără prezența receptorilor β -lipoproteinici pe suprafața acestora. Pe de altă parte, prin analogiile structurale cu plasminogenul (fără a avea însă și activitate proteolitică), blochează situsurile de fixare ale acestuia pe fibrină și inhibă fibrinoliza. Lp(a) este un factor de risc practic independent de ceilalți parametri lipidici, îndeosebi pentru ateroscleroza coronariană și cerebrală. Concentrațiile acesteia variază la populația generală între 0,2-120 mg/dL, pragul patologic fiind 30 mg/dL. La separarea electroforetică migrează în poziție pre-beta, are densitate mai mare însă decât LDL (la ultracentrifugare sedimentează).
6. Apo-C: peptide cu masa moleculară mică, având trei variante - Apo-CI, Apo-CII și Apo-CIII. Se formează în celulele epiteliale intestinale și participă la formarea chilomicronilor, VLDL, lipoproteinelor X, iar într-o măsură redusă și a HDL. Reprezentanții acestei clase de Apo sunt implicați în special în procese de activare/inhibare a enzimelor importante în metabolismul LP.
7. Apo-D: peptide prezente în cantități reduse în toate tipurile de lipoproteine. Au masa moleculară de 24.000 D. Concentrația acestei ApoP este crescută în LCR și hipocampusul pacienților cu boală Alzheimer.
8. Apo E: prezintă în toate tipurile de LP, cu excepția LDL, este implicată în îndepărtarea din circulație a resturilor Ch și VLDL de către LRP hepatici, dar și în efluxul colesterolului din celule (alături de Apo AI); are și proprietăți antioxidante. Este o proteină polimorfă, cel puțin trei izoforme fiind descrise până în prezent: apoE2, apoE3 și apoE4. Cel mai comun fenotip este apoE3/E3 (50-70% din populație). ApoE2/E2 (prezent la 1% din populație) este asociat cu un clearance deficitar al resturilor Ch și de VLDL (dislipidemia cu banda beta largă - IDL), în timp ce forma homozigotă apoE4/E4 se asociază cu risc crescut de boală Alzheimer.

16.2.2 CLASIFICAREA LIPOPROTEINELOR DUPĂ METODA DE FRAȚIONARE

1. Ultracentrifugarea este o metodă utilizată mai ales în cercetare pentru separarea lipoproteinelor după ajustarea densității plasmei la 1,063 g/ml (pragul superior de densitate al clasei LDL); separarea LP se face la o forță centrifugă de 40.000-100.000 g, folosind un echipament special. În urma ultracentrifugării se separă următoarele lipoproteine: chilomicroni, VLDL (very low density lipoproteins), IDL (intermediar density lipoproteins), LDL (low density lipoproteins), HDL (high density lipoproteins). Ultracentrifugarea fracționează lipoproteinele pe baza densității lor, care este cu atât mai mică, cu cât cantitatea lipidelor conținute este mai mare. Spre deosebire de proteine, într-un mediu cu o densitate superioară densității lor, lipoproteinele prezintă în cursul ultracentrifugării fenomenul flotației. Unitatea de măsură a acesteia este valoarea Sf (S =Svedberg, f =flotație). *Tabelul 16.II* prezintă fracțiunile lipoproteinelor din plasmă în ordinea densității respectiv, valorii lor Sf.

2. Migrarea electroforetică în gel de agaroză: în lipoproteinograma (lipidograma) astfel obținută pot fi identificate și evaluate cantitativ lipoproteinele separate. Chilomicronii rămân pe linia de start, LDL migrează împreună cu β -globulinele, VLDL alcătuiesc lipoproteinele pre- β , iar HDL migrează cu α 1-lipoproteinele - fracțiunea cea mai rapidă.

16.2.3 Caracteristicile fracțiunilor lipoproteice (*Tabelul 16.II*):

a. Chilomicronii (Ch) sunt formele emulsionate în plasmă ale grăsimilor neutre de origine alimentară. Lipsesc (sau sunt prezenți în cantități foarte mici - sub 2% din totalul LP) din plasma recoltată pe nemâncate, apar însă în cea postprandială, a cărei opalescență și uneori chiar lactescență este cauzată de grăsimile emulsionate prezente sub formă de picături de diferite dimensiuni. Picăturile groase cu diametrul între 0,5-1,5 μ sunt vizibile cu microscopul optic, folosind obiectivul mic. Conțin 1-2% proteine, cu precădere Apo-B48 și Apo-C, dar și

Tabelul 16.II Caracteristicile fizice și chimice ale principalelor clase de lipoproteine

Caracteristici	LP				
	Chilomicroni	VLDL	IDL	LDL	HDL
Concentrație plasmatică "à jeun" (mg/dL)	0	0 - 50	0	500 - 650	200 - 300
Proprietăți fizice					
Densitate (g/mL)	< 0,95	0,95 - 1,006	1,007 - 1,019	1,020 - 1,063	1,064 - 1,210
Diametru (nm)	75 - 1200	30 - 80	25 - 30	15 - 25	5 - 15
Sf (1,063) #	> 400	20 - 400	12 - 20	0 - 12	-
Migrare electroforetică	rămân la start	pre- β	între β - pre β	β	α 1
(% fiziologic)	0-2 %	5-15%	0%	50-65%	20-30%
Compoziție chimică (% relativ din total)					
Proteine	1 - 2	5 - 10	12 - 16	20 - 25	45 - 55
Trigliceride	90 - 96	50 - 65	25 - 40	6 - 12	3 - 6
Colesterol esterificat	1 - 3	8 - 14	20 - 35	35 - 45	8 - 20
Colesterol liber	1	5 - 8	7 - 11	6 - 10	1 - 6
Fosfolipide	2 - 6	12 - 18	15 - 22	20 - 25	25 - 40

Unitatea de flotație Svedberg = 10^3 cm/sec/dyne/g, într-o soluție de KBr cu densitate 1,063 g/ml (26°C).

cantități reduse de Apo-AII, Apo-AI și Apo-E. În urma descompunerii prin lipoliză a conținutului lipidic neutru al chilomicronilor, densitatea lor crește, iar dimensiunile lor se reduc treptat. Chilomicronii se descompun în circulație sub acțiunea lipoprotein-lipazei, fixată pe suprafața celulelor endoteliale.

b. Lipoproteinele cu densitate foarte mică (Very Low Density Lipoproteins, VLDL, pre- β -LP). Se numesc și chilomicroni endogeni, deoarece alături de cantități reduse (5-15%) de proteine (Apo-C, dar și Apo-B, Apo-E și cantități reduse de Apo-AI și Apo-AII) conțin multe trigliceride și colesterol liber produse în ficat. Sub acțiunea lipoprotein-lipazei se descompun treptat în circulația periferică. Au un rol însemnat în aterogenează. Conținutul normal în VLDL al plasmii este de 5-15% din cantitatea totală a lipoproteinelor.

c. Lipoproteinele cu densitate intermediară (Intermediar Density Lipoproteins, IDL). Se formează în plasma circulantă în urma descompunerii enzimatică a trigliceridelor din chilomicroni și VLDL. Ele lipsesc din plasma recoltată pe nemâncate, cantitatea lor însă crește în cursul perioadelor postprandiale. O variantă a IDL apare și în serul bolnavilor cu dislipidemie ereditară de tip III (boala "benzii beta largi", *broad beta disease*). IDL au o perioadă de înjumătățire plasmatică de câteva ore, se descompun enzimatic ca și chilomicronii și VLDL.

d. Lipoproteinele cu densitate mică (Low Density Lipoproteins, LDL, β -LP). Conțin din abundență colesterol esterificat (40%) alături de 17-25% proteine Apo-B100, produse de hepatocite. Se formează în plasma circulantă în urma descompunerii enzimatică (LPL) a TG din structura chilomicronilor și VLDL precum și a cedării Apo P (cu excepția Apo B100) celorlalte clase de LP. Prin intermediul Apo-B100, capabilă să se fixeze de receptorii celulari specifici, LDL pătrund în celule printr-un mecanism activ de pinocitoză. Colesterolul esterificat prezent în LDL reprezintă un factor de risc aterogen, din care cauză este numit și „colesterol rău”. Din cantitatea totală a lipoproteinelor, plasma normală conține 60-70% β -lipoproteine la bărbați și 50-60% la femei. Există mai multe subclase de LDL, cele mai aterogene fiind cele mici și dense (așa-numitul „pattern B” de LDL).

e. Lipoproteinele cu densitate mare (High Density Lipoproteins, lipoproteinele α 1, HDL), conțin 50% proteine - predominant Apo-AI și Apo-AII, dar și componente ale clasei Apo C. HDL nascent se formează în hepatocite, cu predominanța fosfolipidelor în componenta lor lipidică (conținut în colesterol și TG este minim). În momentul lansării lor în circulație, au formă elipsoidală. În urma captării de colesterol și a esterificării acestuia, macromoleculele devin sferice (din cauza retragerii colesterolului esterificat apolar în miezul particulelor). Astfel colesterolul din periferie este transportat înapoi în ficat de către clasa HDL. Colesterolul esterificat vehiculat de HDL nu reprezintă risc aterogen, fiind considerat „colesterolul bun”. Din totalul lipoproteinelor, în condiții fiziologice, plasma conține 20-25% HDL la bărbați și 25-30% la femei.

f. Lipoproteina-X. Reprezintă o formă patologică de lipoproteină, care se formează în hepatocite în cursul unor stări deolestază. Din punct de vedere structural este LDL, dar conține mai multe fosfolipide și colesterol liber și are Apo-C, molecule de albumină, Apo-AI și Apo-E. În cursul fracționării electroforetice în gel de agaroză, spre deosebire de celelalte

lipoproteine, migrează spre catod. Lp-X apare în ser și în caz de lipsă congenitală a lecitin-colesterol-acil-transferază (LCAT).

16.3 METABOLISMUL LIPIDELOR / LIPOPROTEINELOR

16.3.1 ENZIME ȘI PROTEINE IMPLICATE ÎN METABOLIZAREA LIPOPROTEINELOR ÎN PLASMA CIRCULANTĂ

În cursul transportului lor sanguin, lipoproteinele suferă multiple transformări sub acțiunea diferitelor enzime:

a. Lipoprotein-lipaza (LPL, factorul de clarificare a plasmei): se formează în celulele endoteliale și este ancorată de heparan-sulfați în membranele lor, spre lumenul vascular. Enzima are masa moleculară cuprinsă între 34.000-73.000 D, este activată de Apo-CII în prezența heparinei (care are funcția de cofactor). Ionii Cl⁻ au un efect inhibitor asupra enzimei. Fixând temporar pe suprafața endoteliului chilomicronii exogeni și endogeni (VLDL), enzima descompune trigliceridele din miezul acestora. Acizii grași eliberați în urma lipolizei pătrund în celulele învecinate, unde se metabolizează, iar excesul se fixează la bil de albumine și sunt transportați în plasmă spre alte țesuturi consumatoare. În cursul lipolizei are loc și micșorarea treptată a dimensiunilor chilomicronilor și ale VLDL (odată cu creșterea densității acestora). Resturile chilomicronilor și VLDL (numite de fapt IDL), pot fi captate de ficat prin intermediul receptorilor înrudiți cu receptorul clasic de LDL (LRP - LDL Receptor Related Protein) sau se transformă mai departe în LDL (sub acțiunea LPL). Deși nu este substrat pentru LPL, LDL poate fi captat de aceasta – fenomenul având potențial aterogen prin creșterea timpului de retenție al LDL în peretele vascular.

b. Triglicerid lipaza hepatică (TGLH) este localizată pe suprafața celulelor endoteliale ale capilarelor intrahepatice. Descompune TG din resturile VLDL (parțial digerate de LPL) și din HDL₂ (care transportă în ficat excesul de TG și CE din periferie). Se activează tot în prezența cofactorului heparină, dar nu are nevoie și de prezența Apo-CII (ca LPL).

c. Lecitin-colesterol-acil-transferaza (LCAT) se formează în hepatocite și este excretată în plasmă împreună cu HDL nascent. Enzima este activată de Apo AI și are funcție dublă (este o fosfolipază A₂, dar în același timp și acil transferază) - descompune parțial fosfolipidele (cu precădere moleculele de lecitină) din membranele celulelor periferice sau din HDL, transferând o moleculă de acid gras pe o moleculă de colesterol liber din HDL₃ (esterificarea grupării hidroxilice de la atomul de carbon C3). Colesterolul esterificat își pierde caracterul amfipatic și devine un component apolar, care alunecă în miezul HDL₃ - aceasta transformându-se în HDL₂. Sub această formă ambalată și izolată prin învelișul proteic al HDL, moleculele de colesterol esterificat sunt transportate înapoi la hepatocite.

d. Fosfolipaza A₂ asociată lipoproteinelor (LpPLA₂) catalizează hidroliza fosfolipidelor oxidate din LP, generând acizi grași oxidați, cu potențial proinflamator. S-a descris o asociere între activitatea plasmatică a LpPLA₂ și ateroscleroză, inhibarea enzimei fiind o potențială alternativă terapeutică.

e. Proteina de transfer a esterilor de colesterol (CETP) este produsă de ficat și circulă în sânge legată de HDL. Realizează un transfer de esteri de colesterol de pe HDL pe VLDL, IDL și

LDL, la schimb cu trigliceride. Prin această transformare, HDL va fi mai rapid extras/delipidat de către ficat (prin TGLH), acest fenomen explicând relația inversă între nivelul HDL și al TG serice, precum și apariția LDL mici și dense (extrem de aterogene). CETP este o altă țintă terapeutică în ateroscleroză, blocarea acestei proteine conducând la o creștere cu până la 100% a HDL plasmatic. Rezultatele studiilor populaționale privind eficiența în reducerea riscului cardiovascular, sunt încă așteptate.

f. Lipaza hormon sensibilă (LHS) acționează intracelular (în adipocite, glande sexuale, suprarenale și în mai mică măsură în mușchii scheletici, miocard, macrofage și insulele pancreatice) având rolul de a elibera acizii grași din trigliceridele de depozit și colesterolul din esterii. Este supusă unui reglaj complex pro-lipolitic (prin ACTH și catecolamine) și antilipolitic (insulina), *via* fosforilări de proteinkinaze AMPc dependente.

16.3.2 RECEPTORII DE LIPOPROTEINE ȘI ALTE PROTEINE IMPLICATE ÎN METABOLIZAREA INTRACELULARĂ A LIPIDELOR

16.3.2.1 Receptorul pentru LDL - ApoB/E

Receptorii specifici pentru LDL (**R LDL, receptor ApoB/E**) și resturile Ch sau de VLDL (**LRP**), au ca liganzi Apo B100 sau Apo E (preferabil). Acești receptori sunt proteine mari (839 Aa) cu cinci domenii structurale:

- Capătul amino- (la care se va lega LDL sau resturile VLDL) este alcătuit din șapte secvențe repetitive de aproximativ 40 Aa, șase dintre acestea având resturi de cisteină;
- Cel de al doilea domeniu are structură similară cu precursorul factorului de creștere epidermic (EGFP) și este important în eliberarea LDL de pe receptor (în interiorul endozomilor pH-ul acid favorizează procesul);
- Al treilea domeniu conține numeroase resturi de serină și treonină la care se atașează resturi glucidice prin O-glicozilare (are importanță în exprimarea receptorului pe suprafața membranei celulare);
- Domeniul patru asigură fixarea R LDL în membrana celulară (este bogat în Aa hidrofobi)
- Capătul carboxil conține o secvență cu rol de semnal, necesară pentru internalizarea complexului R LDL - LDL.

După internalizarea receptorului cu ligandul său, aceștia se cuplează cu lizozomii intracelulari, în care receptorul este eliberat rapid și se reîntoarce pe suprafața membranei (ciclul se poate relua de zeci de ori), iar LDL este descompus: Aa și lipidele rezultate intră în fondul metabolic al celulei, fiind utilizate pentru sinteze, eliberare de energie, iar excesul poate fi depozitat, dar exercită și funcții reglatoare importante (*vezi 16.3.3.2*).

Timpul de înjumătățire al receptorilor de LDL este de aproximativ 1,5 zile (prin comparație, la șoarece este de 1,5 ore). Datorită unei afinități mai mici a LDL decât a IDL pentru receptorii Apo B/E (ApoE are o afinitate mai bună decât ApoB100), LDL sunt recirculate 48-72 ore înainte de a pătrunde în celule, ceea ce le crește aterogenicitatea datorită modificărilor survenite în circulație.

16.3.2.2 Receptorii scavenger („gunoier”)

Receptorii scavenger participă la îndepărtarea unor resturi moleculare/ celulare, polianionice, endo- sau exogene, de către celulele cu capacitate fagocitară. Unii dintre aceștia sunt implicați în captarea agresivă în placa de aterom a LP modificate prin oxidare sau acetilare și în transformarea fagocitelor în celule spumoase. În funcție de caracteristicile structurale, receptorii scavenger se clasifică în trei clase:

a. Clasa A (SR - A) sunt glicoproteine trimerice (3 x 80 kD) cu fragmentele C terminale în exteriorul celulei, exprimate mai ales pe suprafața macrofagelor, fiind implicate în internalizarea LDL acetilate sau LDLox. Acești receptori au similitudini dar și diferențe semnificative față de receptorul LDL specific: monomerul este mai scurt (~ 450 Aa), domeniul C terminal este acela la care se fixează ligandul; lanțul este compus din șase domenii structurale: 1) fragmentul N-terminal (50 Aa) se găsește în citosolul celulei; 2) porțiunea hidrofobă ancorată intramembranar (25 Aa); 3) domeniu cu structură bogată în prolină, flexibil, nu foarte bine organizat (75 Aa); 4) structură în alfa-helix (120 Aa); 5) domeniu cu structură asemănătoare colagenului (70 Aa); 6) domeniul extern bogat în cisteină (esențial pentru legarea LP). Această clasă de receptori de LP conține un tip particular de receptor: lectinic (SR – CL); acesta este un receptor endotelial, care are la capătul carboxil un domeniu de recunoaștere carbohidrazic (C-type carbohydrate - recognition domain CRD), înalt specific pentru trizaharidele Lewis (x) de pe suprafața leucocitelor și a unor celule tumorale.

b. Clasa B (SR - B) și receptorul CD36 captează LDLox; au două domenii trans-membranare și capătul carboxil extern bogat în cisteină și înalt glicozilat; se exprimă în caveole membranare – aglomerări în ciorchine a mai multor receptori. Există o subclasă SR-B1 (82 kD) –exprimată mai ales pe hepatocite, care poate interacționa și cu LP native: interacțiunea cu HDL (în care un rol extrem de important îl are Apo AI) joacă un rol primordial în metabolismul HDL și transportul invers al colesterolului; expresia acestui receptor este stimulată de Receptorul Hepatic X (LXR), dar și de PPAR γ (peroxisome proliferator –activated receptor) și NK4 α (factorul nuclear 4 alfa hepatic). Receptorul CD36 este implicat în adeziunea celulară, în fagocitoza celulelor apoptice și în metabolismul acizilor grași cu lanț lung.

c. Clasa C de receptori scavenger sunt proteine transmembranare cu regiunea N-terminală localizată extracelular, conținând structuri de tip mucinic.

d. Alți receptori scavenger: LOX-1 (Lectin-like oxidized LDL receptor-1) a fost izolat din celule endoteliale aortice (SR-EC), macrofage și celule musculare netede vasculare; este indus de stimuli inflamatori și se consideră că are implicații în dezvoltarea leziunilor aterosclerotice.

16.3.2.3 Familia receptorilor PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) și alți receptori nucleari

Receptorii nucleari joacă un rol esențial în metabolismul glucidic și lipidic, fiind activați de o mare varietate de liganzi (inclusiv acizi grași și fibrați). În urma atașării diversilor liganzi, familia PPARs (a, g, b/d) formează heterodimeri cu receptori nucleari (RXR- retinoid X receptor), care derepresează gene responsabile de codificarea unor proteine importante pentru metabolismul lipoproteinelor: LPL, ApoAI, ApoAII, ApoAV.

PPAR- γ este un receptor nuclear cu structură modulară, prezent ubicuitar (abundent în țesutul adipos și placa aterosclerotică), unul din principalii agenți reglatori ai adipogenezei și ai metabolismului glucozei prin medierea acțiunii insulinei pe diferite șesuturi. Există studii care arată ca liganzii PPAR- γ reduc secreția macrofagică de TNF- α și IL-6, iar activarea PPAR- γ la nivelul precursorilor macrofagelor induce expresia CD36 cunoscut a fi un receptor „scavenger” implicat în eliminarea LDLc aterogen.

LXRs (Liver X Receptors) și **FXRs** (Farnesoid X-activated Receptors) au de asemenea roluri importante în metabolismul lipidic. LXR este un receptor activat de excesul de colesterol din celule: stimulează transcrierea genei factorului IDOL (inducible degrader of LDL R), care descompune LDL R, dar și a ABC A1 și ABC G1 (ATP Binding Cassette A1, G1), care sunt esențiale pentru eliminarea/ exportul colesterolului din celule.

16.3.2.4 Familia proteinelor SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins)

Sunt factori de transcriere membranari importanți în activarea unor gene implicate în sinteza colesterolului (SREBP-2) sau a acizilor grași (SREBP-1a și SREBP-1c). Colesterolul și acizii grași exercită un feed-back negativ pe propria sinteză. Genele *SREBP* conțin secvențe intronice care codifică micro-ARN – fragmente de ARN mici (de aproximativ 20 nucleotide), non-codante, care se leagă la capătul 3' netranslatabil (3'UTR) al ARNm cauzând degradarea acestuia sau blocând translația. Micro-ARN-ul 33 (mi-ARN 33) blochează translația ARNm pentru *ABC A1*, *ABC G1* și a genelor implicate în oxidarea acizilor grași, ceea ce conduce la acumularea colesterolului și trigliceridelor în celule.

16.3.3 METABOLISMUL ȘI CIRCUITUL PLASMATIC AL LIPOPROTEINELOR

Căile metabolice ale diferitelor tipuri de lipoproteine au în comun următoarele **etape**:

- *Sinteza*: în urma autoasamblării spontane a lipidelor cu apoproteine în celulele mucoasei intestinale sau în hepatocite se formează lipoproteine „nascente” (primare): Ch, VLDL, HDL - deversate apoi în circulație.
- *Transportul plasmatic / Catabolismul*:
- schimbul neenzimatic de proteine și lipide între lipoproteinele plasmatice - se formează lipoproteine „mature” (secundare).
- hidroliza trigliceridelor din Ch și VLDL duce la apariția resturilor de Ch și VLDL, respectiv a formelor IDL și LDL.
- *Captarea*: chilomicronii secundari, VLDL secundari și IDL sunt captate de către receptorii celulari hepatici (LRP), iar LDL de către receptorii specifici periferici (LDL R).
- HDL *transportă în sens invers colesterolul*, de la periferie la ficat (hepatocitele au HDL receptori: receptori *scavenger* SR B1).

Metabolismul lipoproteinelor poate fi evaluat cel mai bine urmărind diferitele clase de lipoproteine de la locul sintezei la locul de catabolizare:

16.3.3.1 Calea exogenă (metabolismul lipidelor exogene)

Chilomicronii (Ch) sunt transportorii lipidelor exogene (alimentare), absorbite sub formă de monogliceride, acizi grași liberi și colesterol. În reticulul endoplasmatic neted al celulelor intestinale acizii grași liberi sunt reesterificați în trigliceride, sunt înzestrați cu apoproteinele ApoB48 respectiv ApoA I (sintetizate de către reticulul endoplasmatic rugos) și trec inițial în limfă și ulterior ajung în circulația sanguină. În circulație au loc niște schimburi neenzimatic de lipide și Apo P între diferitele tipuri de lipoproteine: CETP transferă CE de pe HDL₂ pe VLDL și LDL, iar TG invers; Apo CII și Apo E trec de pe HDL pe chilomicroni, iar ApoA I invers. Chilomicronii sunt metabolizați în principal în țesutul adipos și muscular, dar și în miocard și glanda mamară lactigenă. Apo CII activează lipoproteinlipaza (LPL) endotelială prin acțiunea căreia *chilomicronii secundari* pierd trigliceride, acestea fiind transformate în acizi grași liberi și glicerol – “prima cascadă lipolitică”. Acizii grași liberi pot fi utilizați în scop energetic de către mușchi, sau pot fi folosiți pentru resinteza trigliceridelor în țesutul adipos. Glicerolul ajunge la ficat și participă la gluconeogeneză. Resturile chilomicronilor (conținând CE) sunt eliminate din circulație de către receptori specifici (LRP) prezenți în ficat (ApoE este ligandul resturilor de chilomicroni). La trei ore postprandial în mod normal nu mai există chilomicroni în circulație ($t_{1/2}$ este de aproximativ 1-2 ore). Colesterolul rămâne în resturile chilomicronilor.

16.3.3.2 Calea endogenă (metabolismul lipidelor endogene)

Calea endogenă începe în ficat, care produce și eliberează în torentul sanguin VLDL. Acestea conțin în miezul hidrofob mai ales TG endogene (sintetizate în ficat), o cantitate mică de CE și FL, iar la suprafață - Apo B100 și Apo E. Sub acțiunea LPL scade conținutul în TG al VLDL - „a II-a cascadă lipolitică” -, resturile VLDL (mai bogate în CE) fiind transformate în LDL. Cel puțin jumătate din LDL formate în această „cascadă lipolitică” sunt rapid preluate în ficat (prin receptori specifici pentru Apo E - LRP); lipidele sunt convertite din nou în VLDL, iar CE în acizi biliari. Restul LDL circulante pierd în continuare TG (sub acțiunea LPL), apoi transferă Apo E pe HDL și sunt transformate în LDL.

În metabolismul lipoproteinelor cu Apo B s-au descris **11 etape** (Figura 16.5):

Lipidele alimentare (TG, colesterol, fosfolipide) sunt emulsionate în duoden în prezența sărurilor biliare formând micelii mixte; AGL și Aa stimulează eliberarea pancreozimin-colecistochininei și a secretinei, care stimulează secreția și eliberarea lipazei pancreatice și a bilei hepatice și veziculare. În prezența unei co-lipaze și a ionilor Ca^{2+} , lipaza pancreatică hidrolizează TG la 2-monogliceride (2-MG) și AGL, acestea putând fi transportate în epitelul intestinal.

În citosolul enterocitelor cea mai mare parte a MG sunt reacilate în DG și TG și o parte din colesterol este esterificat. În reticulul endoplasmic sunt sintetizate Apo P (Apo B48, AI, AIV și la unele specii Apo B100) și anexate grupări hidrocarbonate. În aparatul Golgi lipidele se autoasamblează cu glicoproteinele, formându-se Ch nascenti (primari), care se eliberează prin membrana enterocitară latero-bazală în vasele limfatice și ulterior, prin ductul toracic, în circulația sanguină.

În circulația sanguină Ch sunt supuși unei succesiuni de evenimente cunoscute sub denumirea de “cascada lipolitică”. Inițial au loc o serie de modificări fizice ale Ch primari:

adsorbția Apo CII și E pe suprafață, cu transferul la schimb a Apo AI pe HDL. Concentrația CL este foarte scăzută în Ch primari, comparativ cu endoteliul vascular, elementele figurate sanguine și alte LP, ceea ce stimulează transferul acestuia de pe HDL pe Ch (la schimb cu TG). Unele FL trec de pe Ch pe HDL.

Prin legarea în situsurile "heparin-like" chilomicronii ajung în vecinătatea LPL ancorate în endoteliul capilar; Apo CII prezente pe suprafața Ch, activează specific LPL, care hidrolizează TG accesibile, ceea ce conduce la scăderea volumului și la creșterea densității Ch, care vor deveni Ch secundari; AGL se leagă de albumina plasmatică transportoare și sunt distribuite țesuturilor consumatoare; FL rămân în exces la suprafața Ch și o parte vor fi transferate pe HDL astfel încât raportul FL / CL devine aproximativ 2/1. Această situație și prezența Apo AI în Ch secundari este favorabilă acțiunii LCAT: transformă CL de la suprafața Ch în CE, care alunecă în miezul LP, împingând TG spre suprafața particulei unde sunt accesibile din nou LPL. Astfel conținutul în TG al Ch scade dramatic, în urma acțiunii corelate a celor două enzime formându-se resturile Ch.

Resturile Ch conțin Apo E, astfel încât la întoarcerea sângelui în patul capilar hepatic aceste particule sunt recunoscute de receptorii resturilor Ch (LRP) și rapid îndepărtate din circulație. În citoplasma hepatocitului particulele sunt descompuse în AG, CL, Aa etc, care intră în fondul metabolic celular; AG sunt utilizați ca substrat energetic sau pentru sinteza "de novo" a FL, TG, CL, iar Aa - în sinteze proteice. Substanțele sintetizate sunt resecretate sub formă de VLDL, sau depozitate (TG).

Colesterolul intrat în hepatocit controlează sinteza endogenă a colesterolului, sinteza și exprimarea receptorilor, depozitarea intra-celulară a CE, sinteza acizilor biliari. Îndepărta-

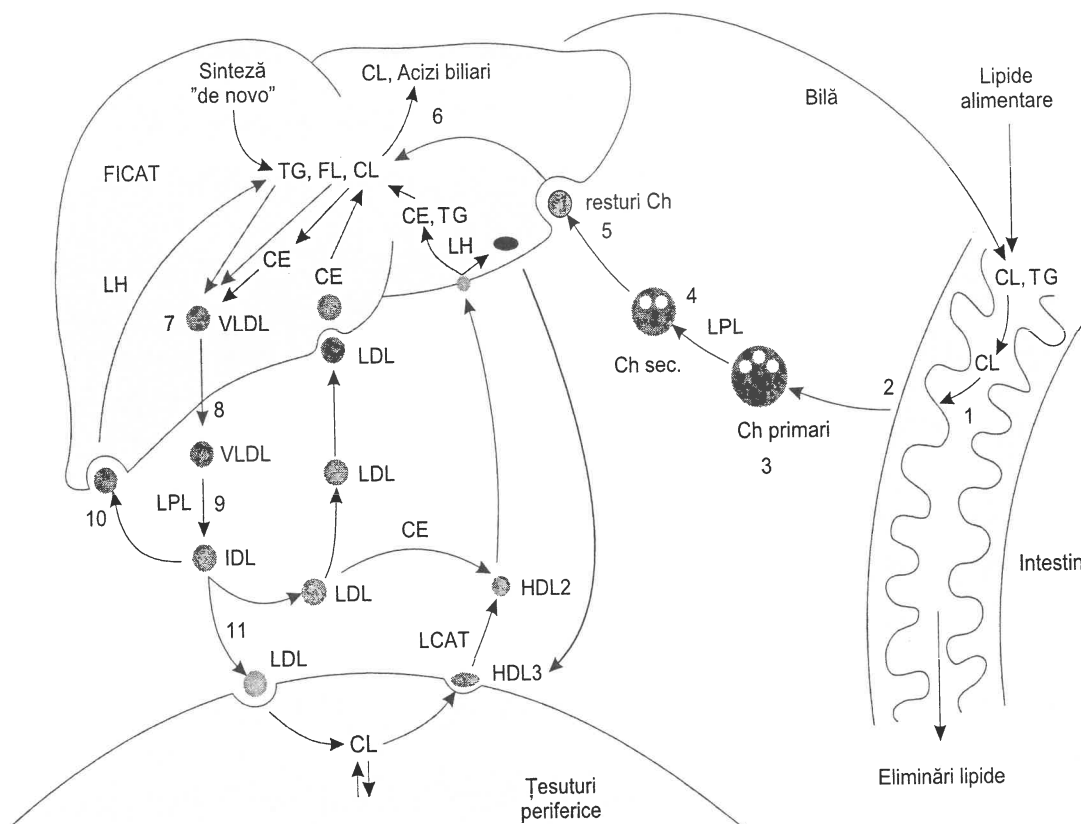


Figura 16.5 Reprezentare schematică a metabolismului lipoproteinelor

rea colesterolului din ficat se realizează prin încorporarea lui în VLDL (și secreția în sângele circulant), fie prin transformarea lui în acizi (săruri) biliari și excreția prin bilă.

În hepatocit VLDL sunt asamblate în reticulul endoplasmic și cisternele aparatului Golgi, într-o manieră similară sintezei intestinale a Ch. Între Apo P din structura VLDL se găsesc în mod obligatoriu Apo B100, E, AI și probabil unele Apo C.

VLDL nascente (primare) sunt eliminate prin exocitoză în spațiul Disse (deci direct în compartimentul plasmatic); VLDL au un raport al lipidelor de suprafață foarte asemănător Ch, cu o cantitate foarte mică de CL; Apo AI este rapid transferată pe HDL în schimbul altor Apo P (mai ales Apo CII), iar CE este adsorbit din diverse surse, ca și în cazul Ch.

În capilarele țesuturilor periferice TG din VLDL sunt hidrolizate de LPL într-o manieră similară Ch, transformându-se în resturi VLDL (VLDL secundare). Resturile VLDL mari sunt preluate de ficat, iar cele mici se transformă în IDL și ulterior în LDL.

IDL pot fi și ele preluate de ficat, prin aceeași receptori ca și resturile Ch sau VLDL (LRP); TG și FL în exces sunt hidrolizate sub acțiunea TGLH, LP devenind mai mici, iar prin cedarea Apo E și C se transformă în LDL. În condiții fiziologice, transformarea resturilor VLDL în LDL are loc rapid și se pare că preluarea hepatică a IDL nu este obligatorie pentru trecerea în LDL, procesul având loc și în torentul circulator ca rezultat al "cascadei lipolitice". Rolul TGLH în această remodelare este însă dovedit.

LDL circulante sunt preluate de celulele periferice prin receptori, de către macrofage (celulele "gunoier"), dacă LDL au fost modificate și de către hepatocite dacă LP sunt în exces (mai mult de $\frac{3}{4}$ din LDL sunt metabolizate hepatic); aproximativ 40% din LDL existente normal în plasmă se catabolizează în 24 ore, timpul mediu de recirculare a LDL fiind de trei zile. Receptorii specifici pentru LDL funcționează la capacitatea maximă la concentrația LDL de 20 mg/dL; deoarece concentrația fiziologică a LDL este de 5-6 ori mai mare, în mod natural tabloul plasmatic al LP este favorabil procesului aterogen.

În timpul proceselor cronologic relatate mai sus, au loc schimburi de colesterol și fosfolipide între LP: CL tinde să circule în sensul realizării unui echilibru (particulele născânde - sărace în CL - captează CL din membranele celulare și LP în transformare); CL este esterificat de LCAT în structura HDL₃; CE trece de la LP în care este abundent reprezentat la LP sărace în CE (de exemplu de la LDL la HDL₃, sau de la HDL₃ la resturile VLDL și Ch) prin intermediul CETP (vezi Figura 16.6); sistemul este astfel într-un echilibru dinamic, cu schimb permanent de lipide și Apo P între LP (mai puțin de Apo B100, care pare cel mai stabil marker al LP din cascada lipolitică).

16.3.3.3 Transportul invers al colesterolului. Sistemul - HDL

Organismul uman nu poate descompune nucleul steranic; pentru eliminarea colesterolului din organism, acesta va fi inițial transportat la ficat și apoi eliminat prin bilă. Metabolismul HDL a fost inițial mai puțin cunoscut și plasat undeva la conexiunea celor două căi mai sus expuse (exo- și endogenă). Unele surse consideră metabolismul HDL "a III-a cascadă lipolitică". Lecitină Coolesterol Acil Transferaza (LCAT), în colaborare cu proteinele de transfer plasmatic al lipidelor (CETP) și HDL, alcătuiesc sistemul de transport invers al colesterolului de la țesu-

mându-l în acizi și săruri biliare. În transportul colesterolului din hepatocit spre canaliculele biliare au un rol important doi transportori hepatici: ABC G5 și ABC G8 (ATP-binding cassette transporter G5 și G8).

Rolul CERP în efluxul colesterolului din celule a fost clarificat ca urmare a studierii unei forme rare de dislipidemie (boala Tangier) cauzată de o mutație la nivelul genei ABC A1; în acest tip de dislipidemie HDL este foarte scăzut sau absent datorită unui catabolism foarte intens al Apo A1. La acești pacienți s-a dovedit acumularea masivă de esteri de colesterol la nivelul splinei, mucoasei intestinale, tonsilelor (care primesc o culoare portocalie intensă) și corneei; acești pacienți prezintă prematur boli cardiovasculare.

În situație complet diferită se află persoanele având varianta Apo A1 *Milano* (denumire primită după grupul descris în satul *Limone sul Garda*, din nordul orașului italian), în care o mutație punctiformă în structura Apo A1 (Arg din poziția 173 este înlocuită cu Cisteină) a condus la apariția unei forme dimere a Apo A1 cu randament sporit în extragerea colesterolului din celulele periferice. Persoanele din grupul Milano nu au prezentat patologie aterosclerotică, chiar la nivele scăzute ale HDL-colesterolului.

16.3.4 METABOLISMUL LIPIDELOR

16.3.4.1 Metabolismul intracelular al colesterolului

Numeroase țesuturi pot sintetiza colesterol "de novo" (din acetil-coenzima A) cu un mare efort energetic, dar preferă să îl primească din exterior captând LDL prin intermediul receptorilor LDL. LDL este principalul transportor al esterilor de colesterol în plasmă, având ApoB100 ca apoproteină unică. LDL este captat de celule (80% de hepatocite, iar restul de fibroblaști, celule musculare netede, adipocite și mai ales de celulele glandulare producătoare de hormoni steroizi: gonade, corticosuprarenale) prin intermediul receptorilor LDL (*Figura 16.5*), conform teoriei lui Goldstein și Brown (premiul Nobel în 1985). Complexul format între LDL și LDL R este internalizat sub forma unei vezicule, care fuzionează cu endozomii intracelulari; pH-ul acid intravezicular favorizează disocierea LDL de receptorul său; receptorul se reîntoarce pe suprafața celulei, iar LDL este descompus în componentele sale, care intră în fondul metabolic comun al celulei.

În celule colesterolul participă la rigidizarea structurilor membranare, este materia primă pentru sinteza hormonilor steroizi, acizilor biliari, vitaminei D. Colesterolul în exces este esterificat sub acțiunea ACAT (AcilCoA: Acil Coolesterol Transferaza). Prin blocarea de către oxisterol a heterodimerului *Receptor Hepatic X – Receptor Retinoid X* (LXR-RXR), complexul *Sterol Regulatory Element - Binding Protein* (SREBP) – SREBP Cleavage – Activating Protein (SCAP) nu se mai activează, iar factorul de transcriere al genei Receptorului LDL (de pe cromozomul 19) și a altor enzime (β HMG CoA sintaza și β HMG CoA reductaza, AG sintetaza) rămâne inactiv.

PCSK9 (proproteîn convertase subtilisin kexin 9) este o proteină de 72 kD, sintetizată în ficat, care se autoclivează în forma activă: o proteină cu 63 kD cu rol în accelerarea

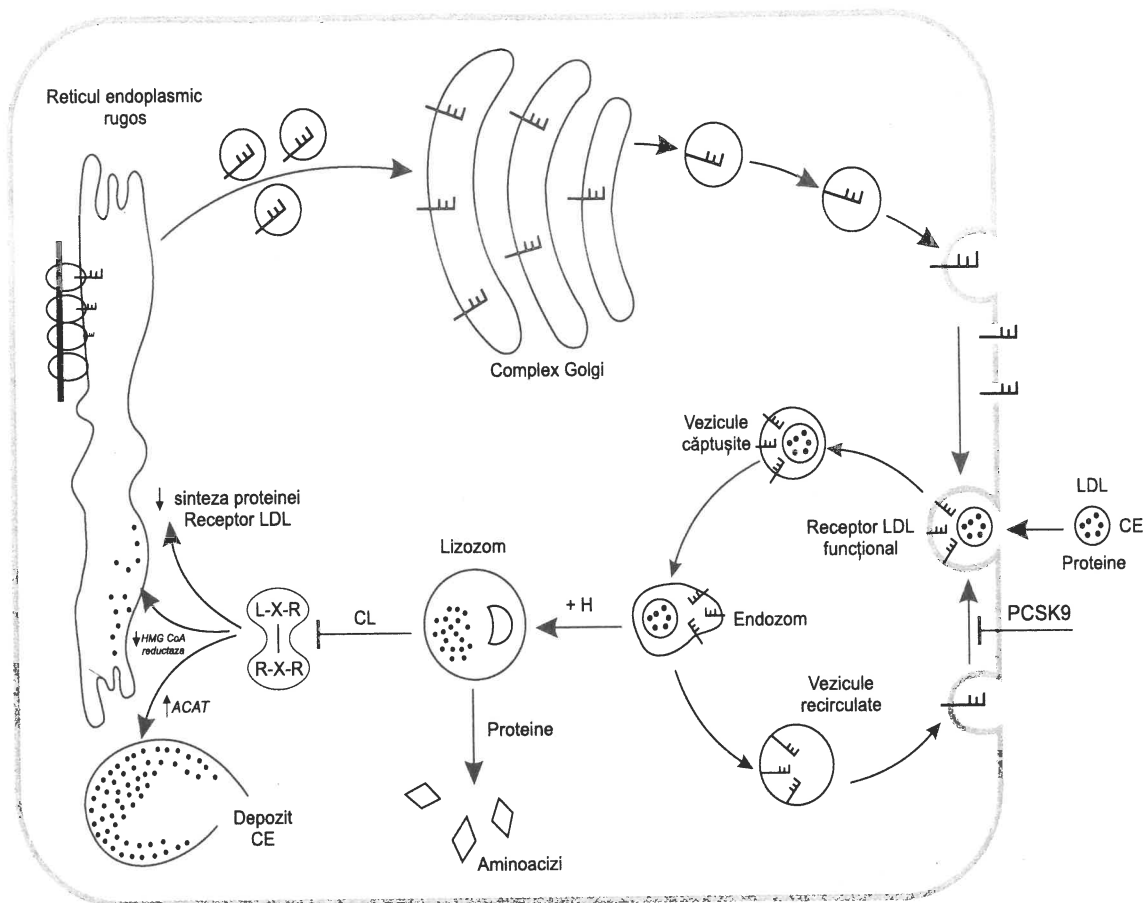


Figura 16.7 Etapele preluării și metabolizării celulare a LDL

degradării LDL R. Mutații ale acestei proteine sunt asociate cu scăderea LDL plasmatic, ca urmare a creșterii timpului de viață al LDL R. Inactivarea genei *PCSK9* și blocajul imunologic al proteinei (cu anticorpi monoclonali specifici), sunt alternative terapeutice promițătoare în hipercolesterolemia familială, producând o scădere suplimentară cu 50-60% a LDL-C, la pacienții aflați pe tratament cu statine.

16.3.4.2 Metabolismul acizilor grași

Acizii grași încorporează o mare cantitate de energie în legăturile covalente ale catenei liniare de atomi de carbon din structura lor. Deși se folosește denumirea de "acizi grași liberi", în realitate aceștia circulă în plasmă legați pe albumine și sunt cedați în lichidul interstițial sub formă de săruri/ săpunuri care se dizolvă ușor în membranele celulare și subcelulare. Acizii grași cu lanț scurt și mediu traversează prin difuziune pasivă membranele mitocondrii și se activează în interiorul acesteia. Acizii grași cu lanț lung (16 ± 4 C) - componenții majori din trigliceridele alimentare și de depozit - necesită activare în citoplasmă (sunt transferați pe CoA de acid gras tiokinază) și apoi transportați în spațiul intermembranar mitocondrial unde sunt preluați de *naveta carnitină* (molecula de carnitină este mai mică decât cea de CoA, pentru care membrana internă mitocondrială este impermeabilă).

Descompunerea oxidativă a acizilor grași prin β -oxidare (Figura 16.8a) este de fapt o succesiune de reacții de dehidrogenare prin intermediul FAD și NAD^+ în 4 etape (similare

cu secvențele de reacții de la succinat la oxalacetat în ciclul Krebs), în urma cărora catenele acizilor grași se fragmentează în compuși C2 (acetil-CoA). AG nesaturați sunt parțial oxidați (pentru descompunerea lor se folosește mai puțin FAD și rezultă mai puțin ATP); descompunerea lor are loc prin succesiunea celor 4 faze ale β -oxidării până la atomul de carbon cu legătură dublă la care prima etapă de dehidrogenare (cu FAD) nu mai este necesară, iar celelalte trei reacții decurg similar. AG având un număr impar de atomi de carbon, se descompun până la compusul C3 (propionil-CoA), care prin fixare de bioxid de carbon (C1), se transformă în succinat (C4), care se oxidează sau se transformă în ciclul acizilor tricarboxilici.

Biosinteza acizilor grași nu se desfășoară prin simpla inversare a β -oxidării din mitocondrii, ci are loc în citoplasmă, sub acțiunea unui complex multienzimatic reductiv comun (alcătuit din șapte enzime), în care predomină NADPH și în cadrul căruia AG formați sunt fixați de o proteină vehiculantă (Proteina Transportor de grupări Acil, PTA). Secvența reacțiilor de biosinteză pornește de la acetil-coenzima-A, care fixează o moleculă de bioxid de carbon (C1) și se transformă în malonil-CoA. Aceasta din urmă se condensează cu o nouă moleculă de acetil-CoA și prin eliminarea bioxidului de carbon fixat anterior, se transformă în acetoacetil-CoA (C4). Prin fixări succesive de malonil-CoA și eliminări concomitente de CO_2 , catena de acid gras se alungește cu fragmente C2. În cursul formării acidului palmitic (C16), se repetă 7 cicluri reductive de condensare și se consumă 14 mol NADPH, proveniți din transformarea acidului malic în acid fosfo-enol-piruvic (by pass-ul gluconeogenezei) și din ciclul pentozo-fosfaților. Schema biosintezei citoplasmatică a acizilor grași este reprezentată în *Figura 16.8 b*.

16.3.4.3 Cetogeneza

În cazul creșterii cantității compușilor C2 (acetil-CoA) în fondul metabolic comun, atât din cauza producției lor excesive, cât și a scăderii însemnate a consumului lor (pentru biosinteze și descompunere), în ficat aceștia se transformă în corpi cetonici (C4): acidul acetil-acetic și acidul β -hidroxi-butiric. În prima fază a cetogenezei, o moleculă de acetoacetil-CoA se condensează cu o moleculă de acetil-CoA, formând acidul β -hidroxi- β -metil-glutaril-CoA, prin eliberarea unei CoA libere. Produsul format pe de o parte reprezintă substratul primar al formării scheletului steric (colesterolului), iar pe de altă parte și cel al cetogenezei. Printr-o scindare enzimatică, molecula acidului β -hidroxi- β -metil-glutaril-CoA se rupe într-o moleculă de acid acetil-acetic (corp cetonc) și într-una de acetil-CoA, care intră din nou în ciclul cetogenezei. Acidul acetil-acetic liber se transformă ulterior prin reducere (NADH) în acid β -hidroxi-butiric sau prin decarboxilare în acetonă, dar aceste transformări nu influențează cu nimic toxicitatea substanței.

16.4 TULBURĂRI ALE METABOLISMULUI LIPIDIC - DISLIPIDEMIILE

Dislipidemiile sunt stări însoțite de modificări calitative și / sau cantitative ale lipoproteinelor. Hiperlipidemiile sunt stări patologice caracterizate prin creșterea concentrației trigliceridelor și / sau a colesterolului peste limitele acceptate ca normale pentru vârsta, sexul și starea

Tabelul 16.III Grupele de hiperlipidemii în funcție de concentrațiile colesterolului și trigliceridelor

Grupul de hiperlipidemie	Lipidele serice (mg/dL)	
	Colesterol	Trigliceride
Hipercolesterolemii:		
• de graniță	200-239 mg/dL	< 160 mg/dL
• moderate	240-300 mg/dL	< 160 mg/dL
• severe	> 300 mg/dL	< 160 mg/dL
Hipertrigliceridemii:		
• de graniță	< 200 mg/dL	160-200 mg/dL
• moderate	< 200 mg/dL	200-400 mg/dL
• severe	< 200 mg/dL	> 400 mg/dL
Hiperlipidemii mixte/ combinate:		
• moderate	200-300 mg/dL	200-400 mg/dL
• severe	> 300 mg/dL	> 400 mg/dL

Clasificarea patogenetică a dislipidemiilor cuprinde două clase principale:

1. Dislipidemii primare în care defectul interesează exclusiv sinteza și / sau descompunerea lipoproteinelor. Acestea pot fi cu *transmitere monogenică* (dominantă sau recesivă) sau cu *transmitere poligenică*, în care se întrepătrunde rolul factorilor metabolici endogeni și de mediu.

2. Dislipidemii secundare, în care tulburarea echilibrului LP este o componentă a dezechilibrului metabolic care însoțește alte boli.

Fiecare entitate patogenetică se încadrează într-un anumit tip biochimic de dislipidemie. Datorită diagnosticului dificil al entității patogenetice, din punct de vedere practic se preferă clasificarea biochimică, bazată pe rezultatele analizelor de laborator.

16.4.1 DISLIPIDEMIILE PRIMARE

Dislipidemiile primare sunt determinate de obicei genetic sau în asociere de către factorii genetici și efecte de mediu.

16.4.1.1 Clasificarea fenotipică

După Fredrickson se diferențiază 6 tipuri de dislipidemii (tipul II are două subclase: a și b, prezentate în *Tabelul 16.V*).

Tabelul 16.IV Valorile maxime admise ale concentrației colesterolului total în funcție de vârstă (National Health and Nutrition Examination Survey – NHANES și Adult Treatment Panel ATP III)

Vârsta	Risc moderat (mg /dL)	Risc crescut (mg /dL)
2-19 ani	> 170	> 185
20-29 ani	> 200	> 220
30-39 ani	> 220	> 240
>40 ani	> 240	> 260

Tabelul 16.V Clasificarea fenotipică a dislipidemiilor primare (Frederickson, 1967)

Tip	Denumirea	Ser	Lp	TG	Col	Simptomatologie
I	Hiperchilomicronemie	+++	Ch	+++	(+)/N	steatoză, <i>lipaemia retinalis</i> , pancreatită
IIa	Hipercolesterolemie izolată	clar	LDL	N	+++	xantelasme, gerontoxon
IIb	Hipercolesterolemie cu hipertrigliceridemie	(+) / clar	LDL, VLDL	++	++	xantelasme, inflamație microvasculară
III	Boala "benzii beta largi"	Clar/(++)	IDL	+++	+++	xantomatoză eruptivă
IV	Hiper-preβ-lipoproteinemie	++	VLDL	+++	+	hepatomegalie, xantoame
V	Forma mixtă ereditară	+++	Ch,VLDL, LDL	+++	+++	adipozitate, xantoame

Această clasificare se bazează pe traseul electroforetic obținut la migrarea în câmp electric și aspectul serului după ce a fost păstrat la 4°C timp de 18-24 ore.

Diferențierea simplă și rapidă a dislipidemiilor

Tipul dislipidemiilor poate fi estimat cu o aproximație destul de bună cu ajutorul testului serului depozitat la rece. Pentru acest scop se recoltează 5 - 10 ml sânge pe nemâncate. Serul format se pune la frigider (4°C) 18 ore, într-o eprubetă așezată vertical. Se apreciază transparența serului, așezând un fond întunecat în spatele eprubetei. Pe baza absenței transparenței, prezenței și aspectului opalescenței, se pot deosebi următoarele forme:

- Ser clar, transparent: lipidemie normală sau prezența unei dislipidemii, care nu duce la apariția opalescenței, deci posibilitatea existenței tipurilor IIa, IIb și IV, cu creșterea cantității colesterolului (LDL) și/sau ușoară a trigliceridelor serice (VLDL).
- Strat (inel) lactescent la suprafață, cu serul inferior transparent: chilomicroni exogeni (tip I).
- Opalescență difuză: creșterea trigliceridelor endogene (VLDL) sau a rămășițelor degradării lipidelor (tipurile III, IV sau IIb).
- Strat (inel) lactescent la suprafață, cu serul inferior opalescent: creșterea simultană a chilomicronilor și VLDL (tipurile III sau V).

Dislipidemia de tip I - Hipertrigliceridemie exogenă (hiperchilomicronemie)

Este o formă rară, caracterizată prin hipertrigliceridemie masivă cu prezența preprandială a chilomicronilor în plasmă. Forma primară este transmisă autozomal recesiv; defectul constă în incapacitatea de a metaboliza chilomicronii, dată de deficiența LPL extrahepatice, sau a cofactorului său, ApoC-II. Poate apare și secundar, în diabet zaharat și disproteinemii. Se manifestă din copilărie prin hepato-splenomegalie, xantomatoză eruptivă, lipaemia retinalis și pancreatite recurente. În ciuda nivelurilor mari de TG, afectarea vasculară prematură este rară.

Dislipidemia de tip IIa - Hipercolesterolemie izolată (creșterea fracțiunii LDL)

În hipercolesterolemia familială activitatea receptorilor LDL variază de la absența totală la aproximativ 25% din activitatea receptorilor normali. Este caracterizată prin hipercolestero-

lemie cu nivel normal de TG. Nivelul LDL este crescut, iar cel al VLDL normal. Cea mai cunoscută formă patogenică este *hipercolesterolemia familială (HCF)*, cu transmitere autozomal dominantă (defectul este localizat pe cromozomul 19: 19p13.1-13.3). S-au descris cel puțin cinci clase de mutații care conduc la anomalii structurale sau funcționale ale receptorului de LDL (afectând sinteza în RER, transportul proteinei în aparatul Golgi și glicozilarea acesteia, defecte la nivelul regiunii aminoterminal de legare a Apo B, mutație punctiformă Y-807-C la capătul carboxil care inhibă internalizarea cuplului receptor-LP și mutații care împiedică recircularea receptorului) consecința fiind incapacitatea îndepărtării corespunzătoare a LDL din circulație:

- Clasa 1 cuprinde alelele nule care au ca rezultat absența totală a receptorilor LDL.
- Clasa 2 cuprinde mutații ale alelor care sunt implicate în transportul receptorilor (afectează modul de pliere a receptorului și transportul acestuia de la reticulul endoplasmatic la aparatul Golgi).
- Clasa 3 cuprinde alelele ce afectează legarea receptorului la ligand (LDL și în unele cazuri - VLDL).
- Clasa 4 cuprinde alelele care afectează internalizarea receptorilor în vezicule acoperite de clatrina la nivelul hepatocitelor.
- Clasa 5 cuprinde alelele deficiente care împiedică disocierea receptorului de ligand și reciclarea receptorului.

Fenotipul de dislipidemie IIa poate apare și secundar, la persoane cu dietă bogată în colesterol, boli hepatice obstructive, sindrom nefrotic, hipotiroidism. Se manifestă prin xantelasme, xantomatoză tendinoasă, gerontoxon și ateroscleroză accelerată. Afectarea coronariană apare precoce, în decadele 3-4 de viață. Criteriile OMS și MedPed utilizate în diagnosticul HCF sunt redate în tabelul 16.VI.

Dislipidemia tip IIb - Hiperlipemie mixtă (creșterea LDL și VLDL)

Este caracterizată prin creșterea atât a LDL cât și a VLDL. Patogenetic, numeroși pacienți cu acest fenotip de dislipidemie, au *hiperlipidemie familială combinată*, (HFC) cu transmitere autozomal dominantă; HFC este caracterizată prin prezența în antecedentele familiale atât a formei IIb, cât și a formelor IIa (cu LDL crescut) și IV (cu VLDL crescut) de dislipidemie. Secundar, apare în aceleași situații ca și forma IIa. De obicei nu prezintă semne fizice. Pre-dispune la ateroscleroză accelerată cu afectare coronariană.

Dislipidemia tip III - Disbetalipoproteinemie - Hiperlipemie mixtă (cu creșterea IDL)

Este o formă rară, caracterizată prin creșterea atât a colesterolului, cât și a TG, dată de o particulă cu densitate intermediară între VLDL și LDL cunoscută sub numele de IDL (intermediar density lipoprotein). Primar, poate fi datorată existenței pe suprafața VLDL a unei apoproteine E (Apo E-2/E-2), care face imposibilă recunoașterea și metabolizarea acestei particule de către receptorii țesuturilor periferice. Secundar, este asociată cu obezitate,

Tabelul 16.VI Criteriile OMS și MedPed utilizate în diagnosticul HCF

	Criteriu	Scor
Istoric Familial	Rude de grad I cu boala CV prematură (debut < 55 ani la bărbați și < 60 ani la femei) și /sau LDL-C mai mare decât 95%	1
	Rude de grad I cu xantomatoză tendinoasă și sau copii < 18 ani cu LDL-C mai mare decât 95%	2
Istoric Clinic	Pacient cu boală coronariană prematură	2
	Pacient cu boală cerebrală sau periferică prematură	1
Examen Fizic	Xantomatoză tendinoasă	6
	Arc corneal < 45 ani	4
LDL-C	> 330 mg/dL	8
	250 - 329 mg/dL	5
	190 - 249 mg/dL	3
	155 - 189 mg/dL	1
HCF sigură		Scor > 8
HCF probabilă		Scor 6-8
HCF posibilă		Scor 3-5
HCF puțin probabilă		Scor < 3

hiperuricemie, hipotiroidism. Pacienții prezintă xantomatoză palmară, tendinoasă și risc crescut de boli vasculare coronariene sau periferice.

Dislipidemia tip IV - Hipertrigliceridemie izolată endogenă (creșterea VLDL)

Este relativ frecventă, putând apare pe fondul unei *hiperlipidemii familiale combinate*. O altă cauză primară o constituie *hipertrigliceridemia familială*, cu transmitere autozomal dominantă și caracterizată prin creșterea VLDL, niveluri normale sau scăzute de LDL și scăderea HDL. Atât creșterea producției, cât și scăderea degradării contribuie la nivelurile mari de VLDL. Secundar, este asociată cu diabetul zaharat, hipotiroidie, insuficiență renală, putând fi exacerbată de numeroși factori de mediu, cum ar fi: dietă inadecvată, consum de alcool și unele medicamente (beta blocante neselective, diuretice tiazidice, contraceptive orale).

Dislipidemia tip V - Hipertrigliceridemie endo- și exogenă (creșterea Ch și a VLDL)

Este caracterizată prin niveluri mari de TG, date de creșterea atât a chilomicronilor cât și a VLDL, care dau plasmei un aspect lactescent. Secundar, apare la pacienți obezi, cu diabet zaharat sau cu hiperuricemie. Se manifestă numai la adult prin xantomatoză eruptivă, hepato-splenomegalie, *lipemia retinalis*, pancreatită, fără să conducă prioritar la afectare vasculară.

Fenotipul se poate modifica la același pacient după un anumit tratament.

16.4.1.2. Clasificarea genetică și metabolică a dislipidemiilor primare:

În dislipidemiile primare, defectul interesează exclusiv sinteza și/sau descompunerea lipoproteinelor (LP). Acestea pot fi cu *transmitere monogenică* (dominantă sau recesivă)

sau cu *transmitere poligenică*, în care se întrepătrunde și rolul factorilor metabolici endogeni și de mediu.

a. Hipercolesterolemia poligenică, comună (cauzată de interacțiunea unor factori genetici multipli, nedefiniți, cu factori de mediu, comportamentali, în special alimentari) se caracterizează, din punctul de vedere al deficienței metabolice, prin supraproducție și scădere a catabolismului LDL. În clasificarea Fredrickson, corespunde fenotipului IIa.

b. Hipercolesterolemia familială (deficiență cantitativă sau calitativă a receptorului de LDL) se caracterizează prin scădere a catabolismului LDL - fenotipul IIa sau IIb.

c. Hiperlipidemia familială combinată (fără o cauză genetică unică și clar delimitată, dar care are ca și consecință o sinteză crescută de Apo B100) se caracterizează printr-o creștere a sintezei de VLDL și LDL - fenotipul IIa, IIb sau IV.

d. Hiperlipidemia cu resturi lipoproteice (incompatibilitate structurală a Apo E2 - receptor ApoB100: ApoE) se caracterizează prin scădere a catabolismului IDL și resturilor chilomicronice - fenotipul III.

e. Hipertrigliceridemia familială (cauză genetică primară necunoscută) se caracterizează prin niveluri crescute ale VLDL și uneori ale chilomicronilor - fenotipul IV sau V.

f. Hiperchilomicronemia familială (cauzată de o deficiență a LPL sau a cofactorului acesteia - Apo C II) = fenotipul I sau V.

g. Hipoalfalipoproteinemia familială - boala Tangier, cu deficit al transportului invers al colesterolului de la periferie la ficat, ca urmare a unei mutații la nivelul genei ABC A1.

16.4.2 DISLIPIDEMII SECUNDARE

Un mare număr de afecțiuni și situații patologice (Tabelul 16.VII), conduc la hiperlipidemii, în aceste cazuri tulburarea echilibrului LP fiind o componentă a dezechilibrului metabolic care însoțește afecțiunea. În unele cazuri (de exemplu în sindromul nefrotic și hipotiroidism), hiperlipidemia este o regulă și nu o excepție.

Afecțiunile hepatice sunt însoțite, în 90% din cazuri, de dislipidemii:

- *bolile colestatice* (intra- sau extrahepatice) se asociază cu hipercolesterolemie, datorată apariției unei LP patologice - LP X;
- *hepatitele acute severe* determină hipertrigliceridemie, probabil prin scăderea activității lipazei hepatice;

Tabelul 16.VII Cauze de creștere secundară a lipidelor

Colesterol crescut	Trigliceride crescute
Dietă	Obezitate
Hipotiroidism	Diabet zaharat
Boli hepatice	Consum abuziv de alcool
Sindrom nefrotic, transplant renal	Dietă bogată în hidrați de carbon, bulimie
Porfirie	Sindrom nefrotic, insuficiență renală cronică
Sarcină	Tratament estrogenic și sarcină

- *afecțiunile parenchimale avansate* (ciroze) sunt caracterizate de hipolipidemie, datorită scăderii sintezei hepatice a LP.

Afecțiunile renale se însoțesc de asemenea cu dislipidemii, care au un crescut potențial aterogen:

- în *sindromul nefrotic* cu hipoalbuminemie ușoară, apare hipercolesteremie; hipoalbuminemia severă este însoțită de hiperlipidemie mixtă, cauzată probabil de cantitatea masivă de AGL captați de ficat prin deficiența de albumină;
- în *insuficiența renală cronică*, hiperlipidemia se datorează IDL și VLDL, iar uneori scăderii HDL;
- după *transplantul renal*, tratamentul corticosteroidic utilizat timp îndelungat, conduce la hiperlipidemii mixte, moderate.

Mai multe clase de medicamente cu utilizare largă în populație, pot induce dislipidemii:

- **diureticele de ansă** pot cauza hiperlipidemie combinată, după utilizare îndelungată;
- **beta-blocantele neselective** cauzează hipertrigliceridemie (de obicei moderată) și uneori scăderea HDL-colesterolului;
- **tratamentele hormonale** (corticosteroizi sau estro-progestative) sunt însoțite de dislipidemii mixte;
- **retinoizii** produc hipertrigliceridemie;
- **medicamentele care induc enzimele microzomale hepatice** (Fenitoin), produc creșterea HDL-colesterolului, uneori suficient pentru a determina o hipercolesterolemie moderată.

16.4.3 EXAMINĂRI DE LABORATOR ÎN DISLIPIDEMII

A. Recoltarea sângelui pentru analiză se face dimineața, după un post alimentar de 10-12 ore. Se recomandă 2-3 determinări separate efectuate la interval de mai mult de o săptămână, pacientul consumând regimul său alimentar uzual. Prezența unor afecțiuni severe (infarct miocardic acut, accident vascular cerebral) modifică tabloul lipidic, de asemenea tratamentul cu heparină, prin eliberarea LPL de pe endoteliul vascular.

B. Colesterolul total și trigliceridele sunt dozările folosite în prima etapă de evaluare a riscului aterogen. Valori crescute ale unuia dintre acești parametri impun efectuarea analizei fracțiunilor colesterolului și lipoproteinelor serice.

C. Analiza lipoproteinelor, presupune evaluarea separată a colesterolului conținut în diversele fracțiuni lipoproteice (HDL-colesterolul și LDL-colesterolul). Se dozează în mod direct HDL-colesterolul, valoarea LDL-colesterolului fiind calculată indirect, pe baza formulei Friedewald:

$$\text{LDL-colesterol} = \text{Colesterol total} - \text{HDL-colesterol} - \text{TG}/5^*$$

**TG/5 reprezintă colesterolul conținut în VLDL (formula nu se poate aplica pentru TG > 350 mg/dL)*

Determinarea proporției fracțiunilor lipoproteice (**lipidograma**) este absolut necesară doar pentru diagnosticul diferențial al dislipidemiilor mixte (tipurile IIb, III și uneori V), dar poate fi utilă și atunci când nu există posibilitatea dozării directe a HDL-colesterolului, sau pentru identificarea prezenței în cantitate crescută a Lp(a) – *Figura 16.7*.

16.5 FACTORII DE RISC ATEROGEN - ATEROSCLEROZA

Factorul de risc este o entitate definită ca orice determinant de natură genetică, ambientală sau comportamentală, dovedit prin studii epidemiologice retrospective sau prospective, ca fiind asociat cu incidența bolii aterosclerotice.

Există două mari clase de factori de risc aterosclerotic:

I. *Nemodificabili*: sexul masculin, vârsta, antecedente familiale sau personale aterosclerotice.

II. *Modificabili*:

- patologici: hiperlipidemia, diabetul zaharat, hipertensiunea arterială, obezitatea;
- obiceiuri negative: fumatul, sedentarismul, dieta.

Termenul de factori de risc aterosclerotici implică o asociere statistică între un obicei, o stare patologică și boala aterosclerotică (chiar dacă relația de cauzalitate nu este evidentă de la prima vedere). De exemplu concentrația plasmatică a colesterolului crește cu vârsta, iar boala coronariană aterosclerotică este prevalentă la adulți. Până în prezent au fost identificați mai mult de 40 de factori de risc, cei mai importanți fiind: hiper-/dislipidemiile, fumatul, hiper-tensiunea arterială, diabetul zaharat, obezitatea, sedentarismul, tulburările endocrine, menopauza, stress-ul, diete necorespunzătoare, duritatea scăzută a apei (lipsa sau cantitatea scăzută a microelementelor), infecții bacteriene sau virale.

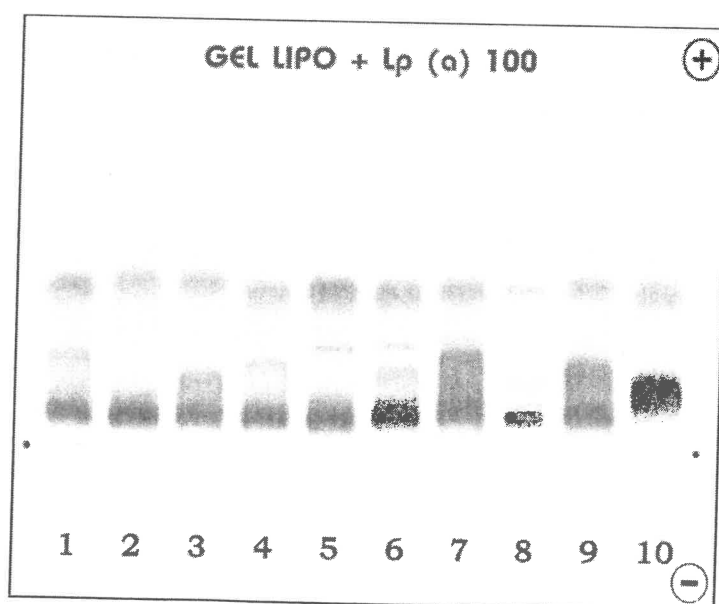


Figura 16.9 Electroforegramă lipoproteică - dinspre anod spre catod: $\alpha 1$ LP, Lp(a), pre β LP, β LP, urme de chilomicroni în traseul 1; Lp(a) în traseele 6, 7; β larg în traseul 10

16.5.1 LIPIDELE, LIPOPROTEINELE ȘI IMPLICAREA LOR ÎN ATEROSCLEROZĂ

Hiperlipidemia este un factor de risc pentru boala aterosclerotică (prin colesterol dar și trigliceride) și pancreatite (prin trigliceride).

16.5.1.1 Hipercolesterolemia

Este un **factor de risc** pentru boala coronariană aterosclerotică, relația cauză-efect fiind demonstrată prin 5 tipuri de studii:

a. *Histopatologice*: leziunile aterosclerotice conțin LDL-colesterol.;

b. *Studii pe animale*: omul are nivelul colesterolemiei mai mare decât restul regnului animal și raport LDL/HDL supraunitar. Dacă se induce hipercolesterolemie la animale ierbivore (iepuri, hamsteri) acestea dezvoltă însă ateroscleroză.

c. *Studii epidemiologice*: marile trialuri populaționale au dovedit o creștere a mortalității prin boli cardiovasculare începând cu colesterolemie peste 150 - 160 mg/dL.

d. *Condiții genetice*: Studiile lui Brown-Goldstein au arătat că hipercolesterolemia familială, caracterizată prin deficit de receptori pentru LDL, duce la creșterea nivelului plasmatic al LDL-colesterolului, ceea ce determină ateroscleroză prematură.

e. *Studii terapeutice*: scăderea colesterolemiei prin dietă sau tratament hipolipemiant scade incidența bolii coronariene direct proporțional cu scăderea concentrației colesterolului sanguin.

Rolul hiper- / dislipidemiilor în ateroscleroză este cert. Corelația pozitivă între concentrația colesterolului și incidența bolilor aterosclerotice a fost dovedită de studii multiple retrospective și prospective, efectuate pe loturi populaționale foarte mari. Acestea arată că între colesterolemie și incidența bolii coronariene există o corelație pozitivă, riscul de instalare a bolii și mortalitatea prin boală coronariană, fiind foarte crescute la concentrații plasmatice ale colesterolului mai mari de 150 mg/dL. De asemenea s-a constatat că o scădere cu 10% a concentrației colesterolului, scade riscul de instalare a bolii coronariene la 50%. Studiile de profilaxie primară sau secundară, au demonstrat că la persoanele la care au fost tratate dislipidemiile, mortalitatea (de cauză cardiacă sau de altă cauză) a scăzut semnificativ.

Hipercolesterolemia datorată în special creșterii LDL (colesterolului LDL) este un factor de risc semnificativ și independent pentru cardiopatia ischemică. Relația dintre colesterolemie și cardiopatia ischemică este continuă, gradată și curbilinie: riscul coronarian începe la valori de 150 mg/dL, crește apoi moderat spre 200-250 mg/dL, pentru ca peste aceste valori creșterea să fie exponențială. Nu există un prag de protecție al colesterolemiei sub care să fie eliminat riscul coronarian.

Scăderea colesterolului HDL este de asemenea un predictor semnificativ și independent al incidenței cardiopatiei ischemice. Concentrația scăzută a HDL-colesterolului, mai ales dacă se asociază cu hipertrigliceridemie, a fost constatată în special la fumători și bolnavii diabetici, dar și la persoanele obeze, sedentare, cu alimentație necorespunzătoare.

Hipertrigliceridemia are putere predictivă a riscului coronarian în special dacă se asociază cu nivele reduse ale colesterolului HDL. Acestea sunt componente ale **sindromului X**

metabolic (definit ca asocierea toleranței scăzute la glucide și hiperinsulinemiei, cu HTA, sedentarism, obezitate, hiperuricemie, hipertrigliceridemie, hipocolesterolemie HDL, prezența LDL dense, de dimensiune mică, hiperlipemie postprandială persistentă, activitate crescută a inhibitorului activatorului plasminogenului PAI-1).

Raportul colesterol total / colesterol HDL, are certă valoare predictivă a riscului coronarian dacă valorile sunt mai mari sau egale cu 5; s-a utilizat anterior și noțiunea de indice aterogen restrâns: colesterol LDL / colesterol HDL, care are valoare predictivă la valori $> 3,5$ la bărbați și $> 2,5$ la femei.

Îmbunătățirea statusului lipidic prin orice mijloace (dietă, exercițiu fizic, tratament hipolipemiant, plasmafereză, by-pass ileal, transplant hepatic etc.), împiedică progresia leziunilor aterosclerotice la bolnavii cu boală coronariană. S-a formulat chiar o regulă în acest sens: „**Regula 2:1:1**” - scăderea cu 2% a LDL-colesterolului duce la scăderea cu 1% a riscului de instalare a bolii coronariene și la o regresie cu 1% a leziunilor deja prezente.

16.5.1.2 Lipoproteinele cu densitate mică (LDL) și lipoproteinele oxidate (LP_{ox})

Metabolismul intracelular al LDL, existența și rolul receptorilor pentru aceste LP în membrana miocitului, fibroblastului și celulei endoteliale, au fost descrise pentru prima dată de Brown și Goldstein. Tema centrală a studiilor lor a fost hipercolesterolemia familială, cauzată de deficitul sau absența receptorilor pentru LDL. Incapacitatea celulelor de a internaliza LDL nu explică ateroscleroza accelerată pe care cei doi cercetători au observat-o la acești pacienți. Această dilemă a fost rezolvată prin descoperirea faptului că LDL aterogene sunt de fapt niște LP modificate (prin oxidare, glicozilare, acetilare etc.), care sunt avid captate de către sistemul fagocitar monocito-macrofagic, posesor al unor receptori speciali pentru aceste LP_{ox} („**scavenger receptors**”); Goldstein a descris pentru prima dată în 1979 receptorul pentru LDL acetilat; spre deosebire de receptorii pentru LDL native, exprimarea membranară a acestor receptori nu este reglată de concentrația intracelulară a colesterolului; astfel, fără feedback-ul negativ al acestei reglări, celulele se încarcă cu colesterol până la saturație și se transformă în saci de grăsime inerti funcțional („**foam cells**”). Oxidarea LP poate avea loc atât extracelular cât și intracelular; toate celulele implicate în aterogeneză pot oxida LP, dar macrofagele par cele mai active. Studiile acelorași cercetători au arătat că, spre deosebire de LDL_{ox} , LDL native nu produc celule spumoase. Aterogenitatea LP_{ox} este datorată unor proprietăți particulare ale acestora (Figura 16.10):

- sunt chemotactice pentru monocitele și limfocitele T circulante (I) (prin activarea genei care codifică în celulele endoteliale factorul chemotactic proteic al monocitelor, MCP-1) și chemostatice pentru macrofagele tisulare (II) (prin moleculele de lizolecitină generate în urma proceselor oxidative);
- sunt chemotactice pentru miocitele din media arterială și stimulează producerea de factori de creștere (MG-CSF) și citokine în endoteliul vascular;
- se acumulează „la saturație” în celulele spumoase (III) și generează materialul centrului necrotic al plăcii aterosclerotice;
- sunt citotoxice pentru celulele endoteliale (IV). LDL_{ox} , dar și LDL native, au efect

- activează limfocitele T (a căror prezență a fost dovedită atât în leziunile precoce, cât și în cele tardive)
- activează limfocitele B – anticorpi anti LDL oxidat, de tip IgM și IgG au fost identificați în plasmă.

16.5.1.3 Lipoproteinele cu densitate mare (HDL)

16.5.1.4 Lipoproteina (a)

The diagram illustrates the process of foam cell formation. At the top, a horizontal row of rectangular cells represents the endothelium, labeled "Celulă endotelială". Above them are "Monocite circulante" (circulating monocytes). Below the endothelium are "Celulă musculară netedă" (smooth muscle cells) and "Macrofag" (macrophages). The process involves several steps: 1. "LDL nativ" (native LDL) enters the endothelial cells. 2. "MCP-1" (monocyte chemoattractant protein-1) is released from the endothelial cells, attracting "Monocite circulante". 3. "M-CSF" (macrophage colony-stimulating factor) is released from the smooth muscle cells, attracting "Macrofag". 4. "Leziune endotelială" (endothelial injury) is shown as a break in the endothelial layer. 5. "LDL nativ" enters the macrophages through the injury. 6. Inside the macrophages, "LDL nativ" is oxidized into "LDLox" (oxidized LDL). 7. "LDLox" is then taken up by the macrophages, leading to the formation of "Celule spumoase" (foam cells) at the bottom. The diagram uses various symbols: rectangles for endothelial and smooth muscle cells, irregular shapes for monocytes and macrophages, and sun-like symbols for oxidized LDL (LDLox).

Figura 16.10 Mecanismele prin care LDL_{ox} inițiază procesul aterosclerotic

și plasminogen, s-a sugerat că Lp(a) ar fi veriga de legătură între ateroscleroză și tromboză: Lp(a) contribuie la aterogeneză atât prin componenta lipidică cât și prin cea apolipoproteică, dacă se găsește în concentrație mai mare de 30 mg/dL.

16.5.2 EVALUAREA GLOBALĂ A FACTORILOR DE RISC CARDIOVASCULAR

În puține cazuri factorii de risc cardiovascular se prezintă individual, intens exprimat (de exemplu dislipidemiile familiale, genetice); de cele mai multe ori aceștia coexistă în interacție exponențială cu unele obiceiuri negative (fumatul, modul de alimentație nerațional, consumul exagerat de alcool și cafea, sedentarismul etc.), factorii de mediu sau situații patologice care conduc la un status proaterogen (diabetul zaharat, afecțiunile hepatice, renale, disfuncțiile tiroidiene, hipertensiunea arterială etc.). De aceea este important să se facă o evaluare globală a stării de risc și o cuantificare a acesteia, în vederea stabilirii conduitei terapeutice, precum și pentru monitorizarea bolnavilor și aprecierea eficienței terapiei.

Societatea Europeană de Cardiologie a recomandat utilizarea unei diagrame pentru aprecierea riscului cardiovascular global, în următorii 10 ani, la persoane aparent sănătoase. Grilele SCORE (*Figura 16.11*) operează cu următorii factori: sex, vârstă, fumat, colesterolemie și valorile tensiunii arteriale sistolice, la care s-au adăugat ulterior și alți factori de risc. Riscul individual se obține prin depistarea careului corespunzător vârstei, sexului, valorii tensiunii arteriale, colesterolemiei și stării de fumător sau nefumător a persoanei în cauză.

Factorii amintiți dau un risc cardiovascular individual, absolut, interpretabil, până la valoarea de 40%. Prezența unor factori de risc suplimentari (obezitate, hipertrigliceridemie, sindrom metabolic, diabet zaharat), modifică riscul în sensul creșterii acestuia; excepție face hiperHDL (peste 60 mg/dL) care poate scădea riscul cardiovascular. Astfel este posibilă o cuantificare mai complexă și în același timp, mai aproape de realitate a riscului cardiovascular global. Importanța diagramei rezidă nu numai în aprecierea gradului de risc, dar și în monitorizarea evoluției acestuia, prin efortul de corectare a factorilor de risc. Pentru țările din regiunea mediteraneană se utilizează o diagramă de interpretare a riscului cardiovascular mai puțin severă, având în vedere tradițiile culinare.

Dacă persoana are deja o boală cardiovasculară manifestă clinic, riscul global de evenimente cardiovasculare este considerat peste 40%.

16.5.3 CONCEPȚIA ACTUALĂ ASUPRA ETIOPATOGENIEI ATEROSCLEROZEI - TEORIA RĂSPUNSULUI PERETELUI VASCULAR LA AGRESIUNE

Teoria multifactorială a aterogenezei pare a fi cea mai plauzibilă dintre teoriile formulate până în prezent, ea fiind susținută de efectul aditiv și sinergic al factorilor de risc cardiovascular. Noile descoperiri au modificat modul de înțelegere a patogenezei aterosclerozei: Ross a reactualizat ideea lui Virchow privind rolul injuriei vasculare în inițierea procesului aterogen și combinând-o cu teoria lui Rokitsky, a propus **“teoria răspunsului la leziune”**. Deosebirea majoră față de teoria originală este aceea că actualmente se consideră că denudarea endotelială și aderarea plachetelor cu eliberarea factorilor de creștere, nu sunt

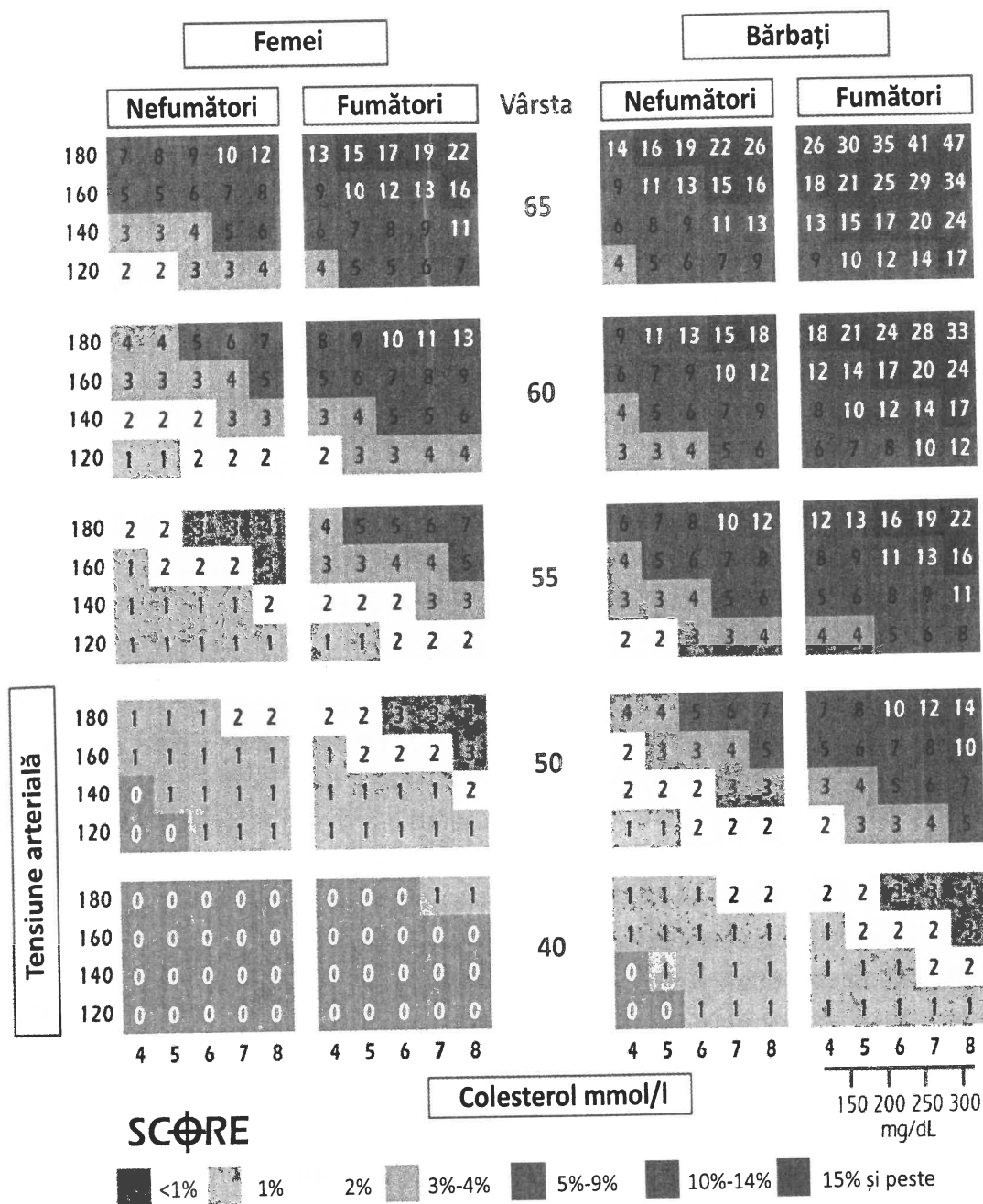


Figura 16.11 Grilele SCORE pentru cuantificarea riscului global de eveniment cardiovascular fatal pe o perioadă de 10 ani în țările europene cu risc crescut, se bazează pe următorii factori de risc: sex, vârstă, fumat, tensiunea arterială sistolică și colesterolul total

absolut necesare pentru inițierea procesului aterogen; perturbarea homeostaziei peretelui arterial este suficientă pentru aceasta.

Teoria modernă a aterosclerozei combină câteva concepte “cheie” pentru înțelegerea patogenezei aterosclerozei:

- importanța injuriei (structurale sau funcționale) peretelui vascular;
- răspunsul la injurie al celulelor imune și musculare netede;
- rolul LP circulante în inițierea și propagarea leziunilor;
- funcția factorilor de creștere și citokinelor;
- rolul trombozelor repetate în progresia leziunii.

Interrelația exactă între factorii determinanți nu este cunoscută, dar importanța integrității endoteliale pentru funcționarea normală a peretelui vascular este unanim acceptată de cercetători. Tendința leziunilor AS de a se localiza la zonele de bifurcație ale arterelor, sugerează rolul fluxului sanguin turbulent în apariția leziunilor. Injuriile vasculare au fost clasificate în trei categorii:

I. Alterările funcționale (disfuncții) ale endoteliului vascular (potențate de HTA, hiperlipoproteinemii, glicozilări neenzimatice ale LP și proteinelor sanguine și endoteliale, prezența lipoproteinelor oxidate, a complexelor imune circulante, a substanțelor nocive din fumul de țigară, homocisteinei, dezechilibre ale balanței coagulare - anticoagulare – fibrinoliză), duc la retenția LP în lipozomi extracelulari și acumularea macrofagelor. Chiar modificări minore, aparent nesemnificative, ale structurii endoteliale (Exemplu: perturbarea suprafeței cationice a glicocalixului de către LDL, apariția unor molecule de adeziune pentru monocite, limfocite și plachete), pot altera interacțiunea celulelor endoteliale între ele și cu țesutul conjunctiv subiacent și iniția procesul aterogen.

II. Denudarea endoteliului (cu lamina elastică internă și media intacte) atrage plachetele sanguine, limfocitele și macrofagele, care produc și eliberează diverse substanțe - factori de creștere și citokine. Succesiunea de mai sus nu conduce invariabil la instalarea plăcii AS. Dacă injuria și răspunsul tisular sunt limitate, leziunea regresează și bariera endotelială se reface. Dacă factorul agresiv se repetă sau persistă, apar infiltrarea intimei cu LP, migrarea și proliferarea celulelor musculare netede, sinteza și acumularea de țesut conjunctiv.

III. Denudarea endoteliului și lezarea intimei, cu acumularea plachetelor și macrofagelor și eliberarea unor produși biologic activi, printre care citokine primare, collagenaza și elastaza. Acest tip de injurie a fost descris mai ales în cazul plăcilor AS deja constituite, leziunile minore (fisurarea plăcii) fiind urmate de apariția unor trombi mici care cresc dimensiunea plăcii. Creșterea presiunii de curgere a sângelui în zona afectată duce la ruperea și dislocarea plăcii, cu formarea unui tromb masiv, obstruant, fenomen concretizat clinic prin apariția sindroamelor coronariene acute. Proporțional cu amploarea procesului inflamator în placa de aterom, din macrofagele implicate se eliberează citokine primare (IL-1 și IL-6), sub acțiunea cărora în ficat se produc reactanții de fază acută (în principal PCR). Tehnicile ultrasenzitive permit dozarea cu precizie chiar a unor concentrații foarte mici de PCR (usPCR), care sunt proporționale cu microinflamația din placa de aterom, respectiv semnalează destabilizarea plăcilor de aterom și iminența sindroamelor coronariene acute.

În instalarea AS precoce se succed patru evenimente critice majore:

- 1. Injuria vasculară**, este urmată imediat de agregarea plachetelor sanguine și aderarea monocitelor circulante, cu eliberarea unor factori chemotactici, inflamatori (inclusiv specii reactive ale oxigenului) și mitogeni.
- 2. Acumularea de lipide** extracelular și intracelular (în celulele endoteliale, musculare netede, macrofage) cu modificarea oxidativă a acestora și formarea celulelor spumoase, dintre care o parte se vor necroza.
- 3. Migrarea, proliferarea și transformarea secretorie a celulelor musculare netede**, cu sinteza și depozitarea în exces de proteoglicani, elastină, collagen.

4. Sinteza de țesut conjunctiv determină îndurarea componentelor, fixarea calciului și ulcerarea ulterioară a plăcii AS.

Studii mai recente au clarificat și unele aspecte ale mecanismului molecular al AS:

- Atașarea plachetelor sanguine și a monocitelor la endoteliul aparent intact depinde, se pare, de interacțiunea unor glicoproteine de suprafață cu situsurile de legare ale endoteliului vascular.
- După aderarea și migrarea în spațiul subendotelial, monocitele se transformă în macrofage și produc o serie de substanțe care participă la evoluția AS: factori chemotactici, mitogeni și inflamatori (prostaglandine - PG, leucotriene - LT, interleukine - IL, bradikinină - BK, serotonină - 5HTA, histamină - His-NH₂, factorul de necroză tumorală - TNF, factorul de creștere derivat din plachete - PDGF), enzime (proteaze, oxigenaze, collagenaze, elastaze), radicali liberi (produc citoliză endotelială și oxidarea LP plasmatică).
- Oxidarea LDL este un proces care poate afecta atât componenta lipidică cât și pe aceea proteică, consecințele în plan funcțional fiind deosebite; LP oxidate sunt citotoxice și imunogene: inhibă relaxarea dependentă de endoteliu a musculaturii netede vasculare, induc formarea și eliberarea de endoteline, molecule de adeziune, factori chemotactici dar stimulează și sistemul imun specific (Limfocitele T și B – produc anticorpi anti LP oxidate).
- Glicozilarea este un aspect particular al modificării LP și proteinelor circulante plasmatică și din componența peretelui arterial (*Figura 16.12*); LDLglc stimulează agregarea plachetară și formează legături covalente cu proteinele peretelui arterial; HDLglc împiedică efluxul colesterolului din celule; glicozilarea collagenului crește rigiditatea peretelui arterial, stimulează aderarea LP și activează macrofagele; glicozilarea proteinelor circulante formează antigene împotriva cărora organismul generează autoanticorpi, iar complexe imune circulante vor determina alte leziuni arteriale.

În **concluzie**, aterogeneza este un proces multifactorial, care evoluează în etape multiple, iar celulele peretelui vascular mediază activ trei statusuri: homeostatic, stabil și patobiologic. Răspunsul acestor celule la injurie este mediat printr-o varietate de procese disponibile celulelor: aderare și comunicare intracelulară (factori solubili, joncțiuni), contractilitate, migrare, proliferare, inflamație, mineralizare, necroză, modularea permeabilității, hemostazei, activității plachetare, modulare fenotipică etc. Prin activarea sau modularea unuia sau mai multora dintre aceste procese, celulele promovează restabilirea homeostaziei sau realizarea unui nou status stabil (striurile lipidice, îngroșarea intimală difuză, modificările datorate vârstei etc.). Injuriile care vor urma conduc peretele vascular, printr-o serie de etape cu o relativă stabilitate (plăcile fibroase), la stadiul în care diverse evenimente pot produce dezechilibrul: hemoragii în placă cu apariția fenomenelor clinic manifeste: sindroamele vasculare acute (coronariene, periferice sau cerebrale).



Considerat multă vreme ca depozit pasiv de energie, ulterior s-a constatat ca adipocitul modulează activ homeostazia metabolică prin secreția unor substanțe denumite adipocitokine, care pot acționa la nivel hipotalamic pentru a regla aportul alimentar și statusul metabolic al organismului.

Adipocitokinele sunt markeri cu ajutorul cărora se poate estima activitatea metabolică a țesutului adipos. La persoanele cu sindrom metabolic, riscul de evenimente acute vasculare este mult crescut. Din punctul de vedere al efectului lor, există două categorii de adipocitokine:

Proinflamatorii (mediatori ai afectării endoteliale și aterosclerozei): leptina, rezistina, IL-6 și proteina C reactivă, TNF-alfa, angiotensinogenul, inhibitorul activatorului de plasminogen (PAI-1).

Cu rol protector, anti-aterosclerotic: adiponectina și monoxidul de azot (NO). Adiponectina reglează sensibilitatea la insulină (scăderea acesteia determinând rezistență la insulină), inhibă sinteza acizilor grași și are, se pare, efecte antiinflamatorii.

16.5.4.1 Leptina

Leptina este un hormon de natură proteică, cu similitudini structurale cu IL-6 și TNF- α , secretată de adipocite direct proporțional cu masa de țesut adipos. Are un rol esențial în metabolismul energetic: diminuează consumul de alimente (la nivelul hipotalamusului influențează senzația de foame sau de sațietate) și crește consumul de energie. A fost dovedit faptul că leptina stimulează activitatea nervoasă simpatică, facilitează utilizarea glucozei și îmbunătățește sensibilitatea la insulină. Cu toate ca, leptina scade aportul alimentar, s-a constatat că pacienții cu obezitate au niveluri serice crescute de leptină. Acest fapt se explică prin apariția unei rezistențe la acțiunile leptinei.

Studiile recente au semnalat faptul ca nivelul plasmatic al leptinei, semnificativ crescut la pacienții obezi, se corelează și cu alți factori de risc coronarian: apolipoproteina B, proteina C reactivă, trigliceridele. De asemenea, s-a constatat ca nivelul ei seric a fost crescut la pacienții care au prezentat evenimente cardiovasculare acute. Este implicată în modularea inflamației, prin acțiunea pe receptori din familia celor pentru IL-6.

16.5.4.2 Rezistina

Poliptid bogat în cisteină, cu o denumire foarte sugestivă (*resistance to insulin*), este produs în țesutul adipos și determină se pare rezistența la insulină, dar și obezitatea. Este considerată liantul între cele două patologii, are însă și alte efecte de altă natură, cum ar fi acela de creștere și acumulare a LDL-colesterolului în patul vascular, dar și de diminuare a numărului de receptori de LDL în membrana hepatocitului. Crește în infecții cronice, putând fi produsă și de monocitele circulante.

16.5.4.3 Adiponectina

Adiponectina este o adipocitokină cu structură proteică care reglează sensibilitatea la insulina și metabolismul energetic. Există o legătură stransă între adiponectină și rezistența la insulină. Adiponectina poate determina insulinorezistență și sindrom metabolic. Nivelurile serice sunt reduse la pacienții cu obezitate. Se consideră că adiponectina scade nivelul acizilor grași circulanți liberi prin stimularea oxidării acestora la nivelul mușchilor scheletici.

Adiponectina circulă în plasmă sub forme variate, cu efecte distincte. S-au identificat doi receptori prin care își exercită efectele:

- AdipoR1 - este predominant exprimat în mușchiul scheletic, gena lui fiind situată la nivelul cromozomului 1p32.1;
- AdipoR2 - se găsește predominant hepatic, gena lui este la nivelul cromozomului 12p13.33.

Receptorii adiponectinei mediază oxidarea acizilor grași liberi și insulinorezistența, fiind implicați în dezvoltarea sindromului metabolic și a DZ tip 2.

Implicarea adiponectinei în bolile cardiovasculare

Efectele adiponectinei nu au fost elucidate complet. Se pare că are și proprietăți antiinflamatorii și antiaterogene prin inhibarea fagocitozei și a producției de factor de necroză tumorală

alfa de către macrofage, diminuând procesele inflamatorii asociate cu ateroscleroza: inhibă adeziunea indusă de TNF- α , expresia ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule-1) și selectinei E, inhibă proliferarea și migrarea patologică a celulelor musculare netede vasculare în cursul procesului de remodelare patologică a peretelui vascular asociat leziunilor aterosclerotice.

În afara efectului direct antiaterosclerotic pe care adiponectina îl exercită la nivel vascular, ea contribuie la reducerea riscului cardiovascular și prin mecanisme indirecte unul dintre ele fiind acela de inductor al enzimei nitric-oxid-sintaza la nivel endotelial (enzima responsabilă de sinteza factorului de relaxare derivat din endoteliu - endothelial derived relaxing factor - EDRF-NO).

16.5.4.4 Factorul de necroză tumorală alfa (TNF alfa)

Factorul de necroză tumorală alfa este o citokină proinflamatorie implicată în patogeneza insulinorezistenței.

La nivelul plăcii aterosclerotice se găsesc cantități mari de ARNm pentru TNF- α care este implicat în creșterea concentrației metaloproteinelor responsabile de ruptura plăcii. La pacienții obezi, TNF- α este hiperexprimat la nivelul țesutului adipos abdominal comparativ cu subiecții normali, existând o corelație inversă între nivelele serice de TNF- α și adiponectina. Reducerea nivelurilor de adiponectină în obezitatea abdominală modifică acțiunea insulinei la nivelul țesuturilor periferice și crește activitatea citokinelor proinflamatorii - TNF- α , IL-6, cu senescența precoce a celulelor precursor endoteliale.

16.5.4.5 Interleukina -6 (IL-6)

IL-6 este o citokină proinflamatorie produsă de mai multe celule, printre care amintim: fibroblaștii, celulele endoteliale, miocitele, adipocitele, constituenții stromei vasculare a țesutului adipos etc. Spre deosebire de TNF- α , care se presupune că acționează în principal local, la nivelul adipocitului (paracrin), IL-6 se găsește în cantități mari în plasma pacientului obez (aproximativ o treime este produsă de țesutul adipos) și determină la nivel muscular insulinorezistența, fiind numită și citokina endocrină pleiotropă.

S-a observat că nivelele circulante de IL-6 se corelează invers cu sensibilitatea la insulină și direct cu creșterea acizilor grași neesterificați, care sunt implicați în inducerea insulinorezistenței.

O creștere precoce a concentrației de molecule solubile de adeziune intercelulară (ICAM-1) și IL-6 a fost demonstrată la pacienții cu sindroame coronariene acute, astfel încât creșterile IL-6 pot identifica pacienții care au cel mai mare beneficiu din intervențiile invazive precoce și din tratamentul antitrombotic pe termen lung. Nivelurile ridicate de peptid natriuretic cerebral (BNP) și de IL-6 sunt puternic corelate cu mortalitatea, atât pe termen lung, cât și pe termen scurt.

16.6 CONSIDERENTE PRIVIND TRATAMENTUL DISLIPIDEMIILOR

Boala coronariană aterosclerotică este cea mai frecventă cauză de mortalitate și morbiditate în majoritatea țărilor dezvoltate. Dislipidemiile sunt recunoscute ca fiind un factor independent de risc pentru această boală. Dacă acest factor este prezent, încetinirea bolii și chiar o posibilă regresie a leziunilor se poate realiza intervenind sistematic, complex și susținut. Prima etapă trebuie să depisteze și să corecteze cauzele dislipidemiilor secundare. Trebuie să se verifice de asemenea prezența factorilor cunoscuți ca amplificând riscul aterosclerotic (hipertensiunea arterială, fumatul, obezitatea) și să se recomande schimbarea modului de alimentație și de viață, precum și a regimului de activitate fizică. Dacă aceste modificări nu corectează nivelurile sanguine ale lipidelor, în etapa următoare se va recurge la medicația hipolipemiantă ghidându-se după profilul lipidic plasmatic, anticipând potențialul benefic al medicației și urmărind atent toleranța pacientului și eventuala toxicitate a substanței.

16.6.1 OBIECTIVUL TRATAMENTULUI

Este aducerea parametrilor metabolismului lipidic la valorile normale (vezi „Risc scăzut”, *Tabelul 16.VII*) și stabilizarea plăcilor de aterom instabile. Conducerea tratamentului se face pe baza rezultatelor de laborator (*Tabelul 16.VIII*), corelate cu existența factorilor de risc crescut cardiovascular (*Tabelul 16.IX*).

Tabelul 16.VIII Interpretarea valorilor parametrilor metabolismului lipidic, în funcție de riscul cardiovascular, determinat de prezența factorilor de risc ATP III (vezi și Tabelul 16.IX)

Parametrul	Valori patologice	Valori critice*
Colesterol total		
Indivizi cu risc scăzut	> 240 mg/dL (6,21 mM/L)	> 260 mg/dL (6,72 mM/L)
Indivizi cu risc crescut**	> 200 mg/dL (5,17 mM/L)	> 240 mg/dL (6,21 mM/L)
Indivizi cu boală AS***	> 180 mg/dL (4,65 mM/L)	> 200 mg/dL (5,17 mM/L)
LDL-Colesterol		
Indivizi cu risc scăzut	>160 mg/dL (4,14 mM/L)	>190 mg/dL (4,91 mM/L)
Indivizi cu risc crescut	>130 mg/dL (3,36 mM/L)	>160 mg/dL (4,14 mM/L)
Indivizi cu boală AS	>100 mg/dL (2,59 mM/L)	>130 mg/dL (3,36 mM/L)
HDL-Colesterol		
Indivizi cu risc scăzut	<35 mg/dL (0,91 mM/L)	<30 mg/dL (0,78 mM/L)
Indivizi cu risc crescut	<40 mg/dL (1,03 mM/L)	<35 mg/dL (0,91 mM/L)
Indivizi cu boală AS	<45 mg/dL (1,16 mM/L)	<40 mg/dL (1,03 mM/L)
Trigliceride		
Indivizi cu risc scăzut	>180 mg/dL (2,06 mM/L)	>500 mg/dL (5,71 mM/L)
Indivizi cu risc crescut	>160 mg/dL (1,83 mM/L)	>200 mg/dL (2,29 mM/L)
Indivizi cu boală AS	>135 mg/dL (1,54 mM/L)	>200 mg/dL (2,29 mM/L)

* Valorile critice sunt acele valori la care există risc de ateroscleroză accelerată, necesitând introducerea de tratament intensiv, inclusiv medicație hipolipemiantă

** Persoane la care sunt prezenți factori de risc indicați în Tabelul 16.IX

*** Antecedente personale de boli cardiovasculare aterosclerotice (profilaxie secundară)

1. Valorile normale nu necesită tratament specific:

- a. în **absența factorilor de risc**, reevaluarea se face la interval de 5 ani;
- b. în **prezența factorilor de risc**, se face corecția acestora și reevaluarea anuală a metabolismului lipidic.

2. Valorile patologice necesită introducerea tratamentului, care se face *în trepte*:a. **Prima treaptă** constă în:

- corectarea factorilor de risc cardiovascular (modificabili) și a cauzelor de dislipidemie secundară.
- regim alimentar și activitate fizică.

Controlul parametrilor metabolismului lipidic se face la 6-8 săptămâni.

b. **Treapta a doua** se aplică atunci când parametrii metabolismului lipidic nu se normalizează în urma măsurilor anterioare; constă în introducerea în plus și a medicației hipolipemiante.**3. Valorile critice** necesită introducerea de la început a tuturor măsurilor terapeutice, inclusiv a tratamentului medicamentos hipolipemiant.**16.6.2 CORECTAREA FACTORILOR DE RISC**

Corectarea factorilor de risc necesită în primul rând tratamentul riguros și corect al bolilor care predispun la dislipidemie: diabet zaharat, hipotiroidism, obezitate, boli hepatice sau renale. Se vor evita diureticele tiazidice și beta-blocantele neselective, deoarece acestea cresc raportul LDL/HDL. La femei în postmenopauză, se ia în discuție în anumite situații tratamentul hormonal de substituție.

16.6.2.1 Regimul alimentar și de viață

Este obligatoriu în toate cazurile de dislipidemie, dar nu numai. Caracteristicile generale ale dietei în dislipidemii sunt următoarele:

1. **Normocalorică**, conținând aproximativ 30 - 35 kcal / kg corp / zi. La supraponderali dieta va fi hipocalorică, aportul fiind redus cu 5-15 kcal / kgcorp / zi.
2. **Normoglucidică** (3-3,5 g/kgcorp/zi), reprezentând 45-55% din conținutul caloric al dietei. Se vor evita dulciurile concentrate precum și cele preparate cu smântână, unt, frișcă, untură, gălbenuș de ou. La cei cu TG crescute sau cu diabet zaharat, aportul de carbohidrați nu va depăși 40-50% din rația calorică zilnică, fiind reprezentat în special de carbohidrați complecși.
3. **Normoproteică** (1-1,5 g/kgcorp/zi), reprezentând 15-20% din consumul caloric zilnic. Se vor prefera proteinele ușor digerabile și îndeosebi cele de origine vegetală, cu efect hipocolesterolemiant.
4. **Hipolipidică** (<1-1,5 g/kgcorp/zi), adică mai puțin de 25-35% din conținutul caloric al alimentației zilnice.
 - a. **Colesterolul** se reduce sub 300 mg/zi (în prima treaptă) și chiar sub 200 mg/zi (în treapta a II-a de dietă), prin renunțarea la alimentele bogate în colesterol, cum ar fi gălbenușul de ou, untul, smântâna, frișca sau viscerele de animale.

b. AG saturați se reduc sub 10% din totalul rației calorice în prima treaptă de dietă și sub 7% în treapta a doua. Pentru aceasta se evită carnea grasă, iar carnea de pasăre se consumă fără piele. Laptele se consumă degresat, evitându-se laptele integral, smântâna, untul și brânzeturile fermentate (datorită conținutului ridicat în cistină). Sunt interzise grăsimile solide, bogate în AG saturați și cele modificate prin tratament termic, care desface parțial dublele legături și formează radicali liberi.

c. AG polinesaturați se suplimentează până la 20% din rația calorică zilnică, prin:

- consumul de uleiuri vegetale (porumb, floarea soarelui, soia, măsline) bogate în acid linoleic; există actualmente uleiuri vegetale speciale cu conținut bogat în AG mono- și polinesaturați și vitamine liposolubile A și E, cu efect antioxidant.
- consumul de pește; uleiul de pește oceanic este utilizat actualmente și ca medicament hipotrigliceridemic.

d. AG mononesaturați (acidul oleic), par a avea un efect favorabil în special asupra HDL-colesterolului; se găsesc în uleiul de măsline.

5. Alcoolul va fi, în general, evitat (maximum 10-30 g alcool pur zilnic), iar la cei cu valori crescute ale TG, va fi interzis.

6. Fibrele alimentare - se vor consuma minimum 25-40 g / zi, din care solubile: 7-13 g / zi .

7. Clorura de sodiu - maximum 4,5-5 g/zi (jumătate din această cantitate și chiar mai puțin la hipertensivi).

Activitatea fizică și scăderea în greutate la supraponderali și obezi, au efect benefic nu numai asupra lipidelor sanguine, ci și în normalizarea tensiunii arteriale și a toleranței la glucoză.

16.6.2.2 Medicația hipolipemiantă

Recomandarea unui tratament hipolipemiant se face în funcție de valorile parametrilor metabolismului lipidic, interpretate în contextul prezenței altor factori de risc cardiovascular (*Tabelele 16.VIII, 16.IX*), precum și după eliminarea cauzelor posibile de dislipidemie secundară sau a tratamentului incorect al acestora (*Tabel 16.VII*). Se cunosc cel puțin 6 clase de hipolipemiante, alegerea acestora făcându-se anticipând beneficiul tratamentului

Tabelul 16.IX Factorii de risc cardiovascular asociați dislipidemiilor

1. Bărbați cu vârste peste 45 de ani
2. Femei postmenopauză
3. Fumatul
4. Hipertensiunea arterială
5. Diabetul zaharat
6. Obezitate severă (peste 30% față de greutatea ideală)
7. Antecedente familiale de ateroscleroză înainte de 60 de ani

în funcție de tabloul lipidic, de patologia anexată a pacientului și de toxicitatea potențială a preparatului (Tabelele 16.X, 16.XI).

Tabel 16.X Efectele principalelor hipolipemiante asupra concentrației plasmatice a diferitelor tipuri de lipide și lipoproteine

Preparatul	LDL-C	HDL-C	TG
Rezine	↓↓↓	–	– / ↑
Fibrați	↑↓	↑↑	↓↓
Statine	↓↓↓↓	– / ↑	↓
Acid nicotinic	↓↓	↑↑	↓↓
Ezetimib	↓↓	–	–
Ulei de pește	– /	– /	↓↓↓

Tabelul 16.XI Alegerea medicației hipolipemiante, în funcție de parametrii metabolismului lipidic (medicația este notată în ordinea preferințelor)

LDL-C	HDL-C	TG	Clasa de Medicație
↑	N	N	Statine - Rezine - Acipimox
↑	N / ↓	↑	Fibrați - Statine - Acipimox
N	N / ↓	↑	Fibrați - Statine - Acipimox - Ulei de pește bogat în AG w3
N	↓	N	Acipimox -Fibrați -Statine

Secheștranti de acizi biliari - Rășinile schimbătoare de ioni (Colestyramina, Colestipol)

a. Farmacologie. Colesterolul reprezintă substratul pentru sinteza acizilor biliari în ficat. Rezinele sunt rășini schimbătoare de ioni, insolubile și nedigerabile, care leagă acizii biliari în intestin și întrerup circuitul enterohepatic al acestora, stimulând astfel utilizarea în ficat a colesterolului prin stimularea sintezei enzimei cheie responsabile de producerea acizilor biliari din colesterol (CYP7A1). Ca urmare activitatea receptorilor pentru LDL-colesterol din celula hepatică este crescută, fiind accelerat turnoverul LDL-colesterolului, cu scăderea nivelului sanguin al acestuia; aceste medicamente nu sunt deci eficiente la persoanele cu deficiență familială (homozigotă) de receptori pentru LDL. Valorile TG pot să crească. Efectul rezinelor se manifestă după 4-5 zile de terapie, iar efectul maxim (dependent de doză) apare la aproximativ 6 săptămâni de la începutul tratamentului.

b. Utilizare clinică. Rezinele reprezintă medicamente preferate în pediatrie și la femei în perioada activă pentru procreare pentru cazurile de creștere izolată a LDL-colesterolului (dislipidemia de tip IIa). **Efectele adverse** cele mai frecvente sunt de natură gastro-intestinală: constipația, colici abdominale, balonare, greață. Interferează cu absorbția tiazidelor, digitalicelor, cumarinicelor, beta-blocantelor, statinelor și vitaminelor liposolubile; aceste medicamente trebuie administrate cu cel puțin 1 oră înainte, sau cu 4 ore după rezine.

Inhibitori ai absorbției colesterolului din intestinul subțire - Ezetimib

a. Farmacologie. Acționează la nivelul marginii în perie a intestinului subțire, inhibând absorbția colesterolului și a fitosterolilor (probabil interacționând cu proteina NPC1L1), fără să afecteze absorbția altor lipide alimentare. Consecința este creșterea preluării hepatice a colesterolului plasmatic (mecanism complementar cu cel al statinelor). Timpul de înjumătățire este de 20-24 ore și nu se metabolizează dependent de citocromul P₄₅₀.

b. Utilizare clinică. Este indicat în hipercolesterolemii izolate, în doză unică zilnică, asociat sau nu cu statine, în funcție de ținta terapeutică, rezultatul fiind aditiv. Efectele asupra TG și HDL-C sunt modeste. **Efectele adverse** se datorează suprasaturării bilei cu colesterol – pericolul apariției litiazei biliare.

Inhibitorii CETP (Torcetrapib, Dalcetrapib, Anacetrapib și Evacetrapib)

a. Farmacologie. Acționează prin blocarea CETP, proteina care transferă esterii de colesterol de pe HDL (sau LDL) pe VLDL, la schimb cu TG. Inhibarea CETP sistează teoretic conexiunea dintre căile aterogenă și antiaterogenă, crescând afluxul de CE dinspre periferie spre ficat, pentru eliminarea acestuia.

b. Utilizare clinică. Este indicat în hipercolesterolemie, mai ales dacă este însoțită de nivele scăzute ale HDL și crescute ale TG (în contextul sindromului metabolic). Poate produce creșteri semnificative ale HDL C (chiar cu 100%) într-o manieră dependentă de doză. Dezvoltarea Torcetrapibului și a Dalcetrapibului a fost oprită în faza III (trialul ILLUMINATE) deoarece a arătat un exces de mortalitate generală la grupul tratat cu atorvastatin și torcetrapib (se pare prin HTA indusă de activarea sistemului RAA). Probabil că efectul secundar obținut nu este unul de clasă, deoarece nu a fost raportat și pentru Anacetrapib și Evacetrapib, care sunt încă în dezvoltare (trialul REVEAL este în curs).

Fibrații (Fenofibrat, Bezafibrat, Gemfibrozil)

a. Farmacologie. Derivații acidului fibric stimulează activitatea lipoprotein-lipazei (LPL) și scad sinteza hepatică a VLDL; prin urmare scade nivelul sanguin al VLDL și deci al TG. HDL-colesterolul crește, iar modificarea LDL-colesterolului este variabilă. În plasmă toți fibrații se leagă competitiv de proteine (mai ales de albumină), eliberând anticoagulantele orale și potențând astfel efectul lor. **Fenofibratul** se absoarbe rapid și se activează în plasmă prin transformare hidrolitică în acid fenofibric; are timpul de înjumătățire de aproximativ 20 de ore. **Bezafibratul** crește HDL prin stimularea sintezei de Apo AI și AII, crește LDL la persoanele cu hipertrigliceridemie (prin activarea LPL) și scade concentrația plasmatică a fibrinogenului. Efectele fibraților se realizează prin intermediul PPAR α (Peroxisome Proliferation Activating Receptors α) PPAR α sunt de fapt factori de transcripție genică. Odată activați de un ligand (fibrații, de exemplu) ajung la nivel nuclear unde interacționează (dimerizează) cu un alt receptor nuclear RXR (Retinoid X Receptor), afectând transcripția unor gene țintă în metabolismul lipoproteinelor și acizilor grași: declanșează transcrierea genelor Apo AI, Apo AII, LPL, enzimelor beta-oxidării mitocondriale a acizilor grași și blochează transcrierea Apo CIII.

Gemfibrozilul este un hipotrigliceridemiant foarte eficient (stimulează LPL și scade sinteza VLDL și ApoB în ficat), fiind indicat mai ales la persoanele cu forme severe. Medicamentul

are un circuit enterohepatic (se reabsoarbe de câteva ori), principala cale de eliminare fiind cea urinară.

b. Utilizare clinică. Fibratii sunt medicamentele preferate pentru cazurile cu TG crescute (tipul III, IV, V de dislipidemie). **Efectele adverse** includ colici abdominale, diaree, greață, cefalee, miozite și favorizarea formării de calculi biliari și urinari. Pe parcursul tratamentului se urmăresc valorile transaminazelor și fosfatazei alcaline (existând riscul de afectare hepatică), precum și creatin kinaza (pentru a depista afectarea musculară). Intrucât eliminarea se face prin urină, insuficiența renală necesită reducerea dozelor (în funcție de concentrația plasmatică a creatininei). Fibratii potențează efectul fenitoiniei, tolbutamidei, cumarinicelor. Sunt **contraindicate** în insuficiența renală acută și boala litiazică.

Statinele

a. Farmacologie. Cel mai recent grup de medicamente hipolipemiante - Statinele - sunt inhibitori ai 3-hidroxi, 3-metil glutaril coenzimă A (HMG CoA) reductazei, enzima cheie în biosinteza hepatică a colesterolului. Scăderea nivelului colesterolului în celula hepatică, stimulează sinteza de receptori membranari pentru LDL-colesterol. De asemenea scad TG și crește (variabil) HDL-colesterolul. Legarea de HMG CoA reductază este specifică și reversibilă, iar rata de sinteză a hormonilor steroizi nu este afectată. Absorbția intestinală se face în proporție de 30%, cea mai mare parte fiind captată în ficat (90% pentru Lovastatin și Simvastatin, iar pentru Pravastatin aproape 100%), epurată pe cale biliară și doar o mică parte circulă legată de proteinele plasmaticice. Nu sunt eficiente la persoanele cu hipercolesterolemie familială homozigotă și la persoanele cu deficit de ApoB-100.

Reacțiile inflamatorii în plăcile de aterom joacă un rol important în patogeneza evenimentelor aterotrombotice acute. Statinele au se pare și efecte pleiotrope (anti-inflamator și imunomodulator), independente de efectul hipocolesterolemiant. O serie întregă de procese imunologice ar putea fi influențate de statine: nivelul sICAM1 și expresia receptorilor acestuia pe suprafața celulelor mononucleate periferice, capacitatea acestora de a produce citokine și de asemenea nivelurile serice ale usCRP (PCR determinată prin metode ultrasensitive – domeniul de valori: 0,1-15 mg/L), peroxizilor lipidici și alți parametri inflamatori, consecință a efectului anti-inflamator. Deoarece ateroscleroza este o boală inflamatorie în toate stadiile sale, iar sistemul imun joacă un rol esențial în patogeneza acesteia, efectele pleiotrope ale statinelor ar putea explica beneficiile clinice rapide obținute la pacienții cu boală coronariană aterosclerotică.

b. Utilizare clinică. Indicația tratamentului cu statine se face la persoanele cu valori crescute ale LDL-colesterolului (tipurile IIa, IIb și III de dislipidemie). **Efectele adverse** sunt reduse, comparativ cu alte hipolipemiante: cele mai frecvente sunt durerile abdominale, balonări, greață. Cele mai importante efecte adverse (din fericire rar întâlnite) sunt citoliza hepatică, rabdomioliza și cataracta. Transaminazele se evaluează la fiecare 6 săptămâni în primele 18 luni de tratament, iar în caz de mialgii se dozează nivelurile CPK; periodic se recomandă examen oftalmologic; uneori potențează efectul anticoagulantelor orale, de aceea

se recomandă controlul periodic al INR-ului. Se poate administra la persoanele diabetice și la persoanele cu afecțiuni renale (datorită căii de eliminare biliare, nu se acumulează în plasmă chiar în caz de funcție renală deteriorată). Asocierea lor cu Ciclosporină trebuie făcută cu precauție (30% dintre persoanele tratate cu statine și care au și tratament imunosupresiv, au prezentat miopatii), administrarea în afecțiuni hepatice și la femei în perioada gravidității.

Acidul nicotinic (niacina) și analogii săi

a. Farmacologie. Este o vitamină hidrosolubilă din grupul B, care influențează metabolismul LP prin inhibiția lipolizei în țesutul adipos și astfel reduce disponibilizarea de acizi grași necesari sintezei hepatice atât pentru VLDL cât și pentru LDL; crește activitatea lipoprotein-lipazei și HDL-colesterolul; acidul nicotinic este singurul medicament care scade Lp(a). În administrare orală se absoarbe rapid, determinând vasodilatație cutanată prin eliberarea de prostaciclina. Efectul hipolipemiant se instalează de asemenea rapid, constând în scăderea TG, LDL-colesterolului, Lp(a) și creșterea HDL-colesterolului.

b. Utilizare clinică. Acidul nicotinic este preparatul cu cel mai larg spectru de efecte favorabile asupra metabolismului LP, dar a cărui utilizare este limitată de numeroase efecte adverse. Indicația principală o constituie situațiile cu valori crescute atât ale LDL-colesterolului cât și ale TG (dislipidemia tip IIb și III) și mai ales în cazurile în care se asociază valori scăzute ale HDL-colesterolului. **Efectele adverse** cele mai comune sunt: eritem facial, prurit, hiperpigmentare, cefalee, hipotensiune, greață, anorexie; ele sunt prevenite prin creșterea gradată a dozelor, administrare după mese și asocierea acidului nicotinic cu aspirină (250 mg), care se administrează cu o jumătate de oră înaintea acidului nicotinic. În administrare prelungită crește acidul uric și produce alterarea toleranței la glucoză, iar la doze mari este toxic hepatic; glicemia, acidul uric și enzimele hepatice trebuie urmărite periodic pe parcursul tratamentului. Este **contraindicat** în afecțiuni gastrice, hepatice și în gută. În ultimii ani s-a încercat obținerea unor preparate care să păstreze efectele terapeutice ale acidului nicotinic și să aibă mai puține efecte adverse: Acipimox, un analog sintetic al acidului nicotinic și preparatele cu cedare lentă la nivelul tubului digestiv au îmbunătățit aceste aspecte.

Probucolul

a. Farmacologie. Este o substanță liposolubilă cu structură asemănătoare vitaminei E, exercitând un efect antioxidant și favorizând captarea hepatică a LDL-colesterolului cu îndepărtarea lui din circulație. Concomitent scade și nivelul HDL-colesterolului, accelerând însă prin aceasta transportul colesterolului din țesuturi spre ficat, cu reducerea depozitelor periferice de colesterol. Nivelul TG nu este influențat. Se absoarbe din intestin în proporție de 10% din cantitatea administrată și se transportă în plasmă în structura lipoproteinelor. Timpul de înjumătățire este mai mare de o lună, efectul menținându-se mult timp după întreruperea tratamentului (până la 6 luni).

b. Utilizare clinică. Probucolul este indicat în tratamentul hipercolesterolemiei (mai ales familiale) cu valori normale sau puțin crescute ale TG, dar cu risc oxidativ crescut (fumători,

diabetici, persoane care lucrează în mediu toxic). **Efectele adverse** sunt rare, incluzând greață, diaree, dureri abdominale, flatulență și prelungirea intervalului QT pe ECG. Este **contraindicat** la persoanele cu HDL-colesterol scăzut, aritmii cardiace și infarct miocardic recent. Se vor monitoriza periodic - în afara parametrilor lipidici - electroliții (inclusiv magneziul) și ECG.

Vitaminele antioxidante

În urma studiilor *in vitro* și *ex vivo*, vitaminele antioxidante (A, E și C) au fost considerate, în trecutul apropiat, ca fiind utile în profilaxia oxidării lipoproteinelor, însă studiile clinice nu au confirmat un efect antiaterosclerotic al acestora.

Uleiul de pește

a. Farmacologie. Uleiul de pește marin conține acizi grași polinesaturați din grupul w-3 (acid eicosapentanoic/EPA și acid docosahexanoic/DHA), care reduc sinteza VLDL în ficat și nivelul chilomicronilor din sânge, scăzând astfel nivelul TG. În afara efectelor asupra metabolismului lipidic, acizii grași w-3 și w-6 au și efect antihipertensiv, antiaritmie și inhibitor al proliferării celulelor musculare netede. Fiind precursori ai prostaglandinelor, EPA și DHA reduc agregarea plachetară.

b. Utilizare clinică. Indicația uleiului de pește o constituie situațiile cu valori sever crescute ale TG (prezintă risc crescut de pancreatită acută), care nu răspund în mod adecvat la alt tratament hipolipemiant. **Efectele adverse** sunt reduse, putând apare, greață, diaree, creșterea glicemiei, LDL-colesterolului și timpului de sângerare, în general fără importanță clinică. Asocierea cu antiagregante plachetare precum aspirina sau blocanții de receptori de ADP, poate crește riscul de sângerare. Sunt **contraindicați** în hipercolesterolemie.

Terapia chirurgicală

By-pass-ul ileal parțial (extirparea ultimilor 200 cm ai treimii inferioare a ileonului) modifică semnificativ concentrația lipidelor serice.

Plasmafereza

Acest tip de terapie este indicat la persoanele cu concentrații ale LDL-colesterolului mai mari de 250 mg/dL, în ciuda unei diete adecvate asociată cu tratament hipolipemiant la dozele terapeutice maxime acceptate, la persoanele cu concentrații ale Lp(a) mai mari de 40 mg/dL și la persoane cu boală aterosclerotică prematură (de obicei persoane cu hipercolesterolemie familială homozigotă).

16.6.3 CONDUCEREA TRATAMENTULUI

a. Inițierea tratamentului se face în funcție de valorile colesterolului și TG (Tabelele 16.III, 16.XI). Pentru reducerea efectelor adverse, dozele sunt crescute progresiv. Rezultatele se apreciază prin dozarea colesterolului și TG după 4-6 săptămâni de tratament.

b. Modificarea tratamentului ales inițial se face atunci când:

- nu apare un răspuns eficient după 2-3 luni de tratament cu doza maximă admisă sau tolerată,

- apar efecte adverse semnificative în urma tratamentului eficient.

Opțiunile terapeutice în această situație sunt schimbarea hipolipemiantului cu un altul, folosit tot ca monoterapie și/ sau asocierea a două sau chiar trei hipolipemiente.

16.7 PREZENTĂRI DE CAZ

16.7.1 HIPERCOLESTEROLEMIE FAMILIALĂ

O femeie de 39 ani se prezintă pentru evaluarea riscului cardiovascular într-un centru specializat, știind de câțiva ani că are hipercolesterolemie. Este normoponderală (IMC 23 kg/m²), normotensivă (125/75 mmHg), nu fumează, urmează o dietă hipolipidică (sub 30% din calorii) / hipocolesterolemiantă (mai puțin de 200 mg colesterol/zi) și face exerciții fizice regulat, nu folosește anticonceptive sau hipolipeminate. Istoricul familial este semnificativ: mama (60 ani) are hipercolesterolemie severă (colesterol: 300 mg/dL) fiind pe tratament cu statine.

La examenul medical nu s-au constatat modificări semnificative la ecografia carotidiană, ale vaselor retinei sau ale electrocardiografei, pacienta prezenta însă xantomatoză la nivelul articulațiilor metacarpo – falangiene.

Examinările de laborator au arătat: colesterolul total - 380 mg/dL, trigliceride - 60 mg/dL, HDL-C - 58 mg/dL, LDL-C - 310 mg/dL.

Comentariu:

Antecedentele familiale și concentrațiile colesterolului total și LDL, sugerează o hipercolesterolemie familială. Riscul de evenimente cardiovasculare (conform grilelor SCORE) este de 10%. Având în vedere că pacienta urmează deja un regim alimentar și de viață corect (fără să aibă alți factori de risc), în urma căruia totuși colesterolemia depășește pragul critic (iar indexul aterogen total este 6,55), trebuie introdus tratamentul cu un agent hipocolesterolemiant, preferabil blocant de HMG-CoA reductază.

16.7.2 DISLIPIDEMIE MIXTĂ, SECUNDARĂ

Un bărbat de 48 ani se prezintă la dermatolog cu un rash maculopapular pe abdomen. Este hipertensiv tratat cu atenolol, a câștigat în greutate 8 kg în ultimul an, nu ține regim alimentar, fumează ocazional și consumă frecvent alcool. În familia sa există mai multe persoane diabetice și bunicul a decedat în urma unui accident vascular cerebral hemoragic. La examenul medical bărbatul prezenta tensiunea arterială: 145/95 mmHg, înălțimea: 180 cm, greutatea: 105 kg, obezitate abdominală, ficat palpabil 4 cm sub rebordul costal. Examinările de laborator au arătat: colesterolul total - 280 mg/dL, trigliceride - 360 mg/dL, HDL C - 38 mg/dL, LDL C - 170 mg/dL, glicemia - 120 mg/dL, acidul uric - 8,9 mg/dL, GGT- 90 U/L.

Comentariu

2

Antecedentele personale și familiale, obezitatea (IMC 32,4 kg/m²), colesterolul total și TG, sugerează o dislipidemie mixtă secundară regimului alimentar dezechilibrat, consumului excesiv de alcool. Riscul de evenimente cardiovasculare (conform grilelor SCORE) este de 20-40%, accentuat de sindromul metabolic ale cărui componente sunt ușor de recunoscut

între datele clinice și paraclinice ale pacientului (hipertensiune / obezitate/ toleranță scăzută la glucoză/ hiperTG/ hipoHDL-C). Având în vedere că pacientul nu urmează un regim alimentar și de viață corect, acesta trebuie introdus imediat, completat cu un tratament hipolipemiant, preferabil cu acțiune mixtă (hipo-trigliceridemiant și hipocolesterolemiant).

16.7.3 NU NEGLIJAȚI NICIODATĂ TRIGLICERIDELE ȘI HDL C !

La serviciul de urgență se prezintă o persoană de sex masculin în vârstă de 39 ani, cu dureri retrosternale cu caracter anginos, cu debut brusc în urmă cu o oră. Examinările de laborator (cTnI, CK MB, usCRP), ECG și coronarografia efectuate în urgență au evidențiat modificări caracteristice pentru infarctul acut de miocard. S-a practicat PTCA de urgență cu implantarea unui STENT metalic pe artera coronară descendentă anterioară (stenozată în proporție de 60% cu accident trombotic în placa de aterom); terapia cu heparine cu greutate moleculară mică, blocați de GP IIb/IIIa, beta blocant și statine, a fost instituită imediat.

Pacientul a fost investigat ulterior pentru parametrii metabolismului lipidic; rezultatele obținute au fost următoarele:

- Colesterol total - 320 mg/dL
- TG - 250 mg/dL
- HDL C - 30 mg/dL
- LDL C - 240 mg/dL

Comentariu

La anamneza mai atentă, pacientul relatează că știa de hipercolesterolemie (a mai avut rezultate similare la controalele medicale anterioare), dar pentru că și tatăl său avea valori similare ale colesterolului (colesterol-300 mg/dL, TG-100 mg/dL, HDL C - 50 mg/dL, LDL C-230 mg/dL), fără să prezinte până la vârsta actuală (65 ani) patologie cardiacă, nu a acordat importanță parametrilor metabolismului lipidic.

Acest caz arată că la concentrații similare ale colesterolului, asocierea unor valori normale ale TG și HDL-C (în cazul tatălui) poate proteja împotriva aterosclerozei.

16.7.4 PROFILAXIE PRIMARĂ LA O FEMEIE DE VÂRSTĂ MEDIE, CU MULTIPLI FACTORI DE RISC

Femeie de 42 de ani, fumătoare, normoponderală, fără antecedente personale semnificative, dar cu tatăl decedat la 62 ani cu IMA și o mătușă cu AVC la 60 de ani, se prezintă la un control de rutină efectuat de angajator. Greutatea este de 65 kg, la 165cm înălțime (IMC = 23,87 kg/m²), TA=119/72 mmHg, iar parametrii de laborator:

- Colesterol total - 204 mg/dL
- TG - 160 mg/dL
- HDL C - 46 mg/dL
- LDL C - 126 mg/dL

Comentariu

Conform grilelor SCORE, persoana prezintă un risc scăzut. Având în vedere antecedentele familiale, faptul că fumează, iar TG și HDL-C sunt la limita valorilor recomandate, medicul angajatorului solicită în continuare o determinare de usCRP (marker de microinflamație în placa de aterom). Independent de ceilalți factori de risc cardiovascular, usCRP are valoare predictivă mai bună decât LDL-C pentru riscul de evenimente acute cardiovasculare. La pacienta de față, usCRP a avut concentrația de 4,5 mg/L, ceea ce o poziționează în categoria pacienților cu risc mare de evenimente cardiovasculare, mai mare decât rezultă din concentrația serică a colesterolului total sau LDL-C.

PRINCE, 4S, HPS, REVERSAL, PROVE IT-TIMI 22 și alte trialuri au dovedit că Statinele scad PCR cu 15-25% în 6 săptămâni de la inițierea tratamentului. Scăderea în greutate, exercițiul fizic și renunțarea la fumat, au de asemenea rol în scăderea PCR.

16.7.5 ÎN DIABETUL ZAHARAT, DISLIPIDEMIA ESTE FRECVENTĂ

Un pacient de sex masculin, în vârstă de 67 de ani, cu diabet zaharat de tip 2 și hipertensiune medie, este tratat prin dietă și derivați de sulfonil –uree (potențează efectul eliberator al insulinei din celulele beta pancreatice, de către hiperglicemie), iar hipertensiunea cu inhibitori de enzimă de conversie a angiotensinei. La controlul periodic efectuat la cabinetul de diabetologie, prezintă următoarele rezultate de laborator:

- Glicemia - 120 mg/dL
- HbA1c - 6,1%
- Colesterol total - 270 mg/dL
- TG - 285 mg/dL
- HDL C - 30 mg/dL
- LDL C - 183 mg/dL

Comentariu

Diabetul zaharat este considerat echivalent de boală cardiacă aterosclerotică, riscul pe 10 ani de a face o formă clinic manifestă a bolii fiind peste 20%. La acest pacient, deși diabetul este corect controlat, toți parametrii lipidici sunt modificați. Valoarea scăzută a HDL-colesterolului este frecvent întâlnită la pacienții cu diabet. Asocierea unui hipolipemiant este obligatorie la acest pacient (derivații de acid fibric sunt cei mai indicați, în situația de față).

Bibliografie recomandată

1. Albert M.A., Danielson E., MIA; Rifai N., Ridker P.M.-*PRavastatin Inflammation/ CRP Evaluation trial*; JAMA 2001;286;64-70.
2. Bays H.E., Stein E.A.- *Pharmacotherapy for dyslipidemia: current therapies and future agents*. Expert Opin Pharmacother 2003;4:1901-38.
3. Bays H.E. - *Extended-release niacin/lovastatin: the first combination product for dyslipidemia*. Expert

între datele clinice și paraclinice ale pacientului (hipertensiune / obezitate/ toleranță scăzută la glucoză/ hiperTG/ hipoHDL-C). Având în vedere că pacientul nu urmează un regim alimentar și de viață corect, acesta trebuie introdus imediat, completat cu un tratament hipolipemiant, preferabil cu acțiune mixtă (hipo-trigliceridemiant și hipocolesterolemiant).

16.7.3 NU NEGLIJAȚI NICIODATĂ TRIGLICERIDELE ȘI HDL C !

La serviciul de urgență se prezintă o persoană de sex masculin în vârstă de 39 ani, cu dureri retrosternale cu caracter anginos, cu debut brusc în urmă cu o oră. Examinările de laborator (cTnl, CK MB, usCRP), ECG și coronarografia efectuate în urgență au evidențiat modificări caracteristice pentru infarctul acut de miocard. S-a practicat PTCA de urgență cu implantarea unui STENT metalic pe artera coronară descendentă anterioară (stenozată în proporție de 60% cu accident trombotic în placa de aterom); terapia cu heparine cu greutate moleculară mică, blocați de GP IIb/IIIa, beta blocant și statine, a fost instituită imediat.

Pacientul a fost investigat ulterior pentru parametrii metabolismului lipidic; rezultatele obținute au fost următoarele:

- Colesterol total - 320 mg/dL
- TG - 250 mg/dL
- HDL C - 30 mg/dL
- LDL C - 240 mg/dL

Comentariu

La anamneza mai atentă, pacientul relatează că știa de hipercolesterolemie (a mai avut rezultate similare la controalele medicale anterioare), dar pentru că și tatăl său avea valori similare ale colesterolului (colesterol-300 mg/dL, TG-100 mg/dL, HDL C - 50 mg/dL, LDL C-230 mg/dL), fără să prezinte până la vârsta actuală (65 ani) patologie cardiacă, nu a acordat importanță parametrilor metabolismului lipidic.

Acest caz arată că la concentrații similare ale colesterolului, asocierea unor valori normale ale TG și HDL-C (în cazul tatălui) poate proteja împotriva aterosclerozei.

16.7.4 PROFILAXIE PRIMARĂ LA O FEMEIE DE VÂRSTĂ MEDIE, CU MULTIPLI FACTORI DE RISC

Femeie de 42 de ani, fumătoare, normoponderală, fără antecedente personale semnificative, dar cu tatăl decedat la 62 ani cu IMA și o mătușă cu AVC la 60 de ani, se prezintă la un control de rutină efectuat de angajator. Greutatea este de 65 kg, la 165cm înălțime (IMC = 23,87 kg/m², TA=119/72 mmHg, iar parametrii de laborator:

- Colesterol total - 204 mg/dL
- TG - 160 mg/dL
- HDL C - 46 mg/dL
- LDL C - 126 mg/dL

Comentariu

Conform grilelor SCORE, persoana prezintă un risc scăzut. Având în vedere antecedentele familiale, faptul că fumează, iar TG și HDL-C sunt la limita valorilor recomandate, medicul angajatorului solicită în continuare o determinare de usCRP (marker de microinflamație în placa de aterom). Independent de ceilalți factori de risc cardiovascular, usCRP are valoare predictivă mai bună decât LDL-C pentru riscul de evenimente acute cardiovasculare. La pacienta de față, usCRP a avut concentrația de 4,5 mg/L, ceea ce o poziționează în categoria pacienților cu risc mare de evenimente cardiovasculare, mai mare decât rezultă din concentrația serică a colesterolului total sau LDL-C.

PRINCE, 4S, HPS, REVERSAL, PROVE IT-TIMI 22 și alte trialuri au dovedit că Statinele scad PCR cu 15-25% în 6 săptămâni de la inițierea tratamentului. Scăderea în greutate, exercițiul fizic și renunțarea la fumat, au de asemenea rol în scăderea PCR.

16.7.5 ÎN DIABETUL ZAHARAT, DISLIPIDEMIA ESTE FRECVENTĂ

Un pacient de sex masculin, în vârstă de 67 de ani, cu diabet zaharat de tip 2 și hipertensiune medie, este tratat prin dietă și derivați de sulfonil –uree (potențează efectul eliberator al insulinei din celulele beta pancreatice, de către hiperglicemie), iar hipertensiunea cu inhibitori de enzimă de conversie a angiotensinei. La controlul periodic efectuat la cabinetul de diabetologie, prezintă următoarele rezultate de laborator:

- Glicemia - 120 mg/dL
- HbA1c - 6,1%
- Colesterol total - 270 mg/dL
- TG - 285 mg/dL
- HDL C - 30 mg/dL
- LDL C - 183 mg/dL

Comentariu

Diabetul zaharat este considerat echivalent de boală cardiacă aterosclerotică, riscul pe 10 ani de a face o formă clinic manifestă a bolii fiind peste 20%. La acest pacient, deși diabetul este corect controlat, toți parametrii lipidici sunt modificați. Valoarea scăzută a HDL-colesterolului este frecvent întâlnită la pacienții cu diabet. Asocierea unui hipolipemiant este obligatorie la acest pacient (derivații de acid fibric sunt cei mai indicați, în situația de față).

Bibliografie recomandată

1. Albert M.A., Danielson E., MIA; Rifai N., Ridker P.M.-*PRavastatin Inflammation/ CRP Evaluation trial*; JAMA 2001;286;64-70.
2. Bays H.E., Stein E.A.- *Pharmacotherapy for dyslipidemia: current therapies and future agents*. Expert Opin Pharmacother 2003;4:1901-38.
3. Bays H.E. - *Extended-release niacin/lovastatin: the first combination product for dyslipidemia*. Expert

- Rev Cardiovasc Ther 2004;2:485-501.
4. Baynes J.W., Dominiczak M. – *Medical Biochemistry*, Ed.2, Elsevier Mosby, 2005, 189-244, 299-313.
5. Baynes J.W., Thorpe S.R. – *Glycoxidation and lipoxidation in atherogenesis*, Free Radic Biol Med, 2000, 28: 1708 – 16.
6. Bishop M.L., Fody E.P. – *Reference values for frequently assayed clinical chemistry analytes*. In *Clinical Chemistry: Principles procedures, correlations*, Ed 5, Philadelphia, 2005, Lippincott, Williams & Wilkins.
7. Bosch J, Salim Y., Sheridan P. et al. - *Vitamin E Supplementation Does Not Improve Cardiovascular Events and May Increase the Risk for Heart Failure*; Cardiology Online, March 23, 2005, [http://www.cardiologyonline.com/journal_articles/VitaminE supplementation.htm](http://www.cardiologyonline.com/journal_articles/VitaminE%20supplementation.htm)
8. Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. *Clinical significance of high-density lipoproteins and the development of atherosclerosis: focus on the role of the adenosine triphosphate-binding cassette protein A1 transporter*. Am J Cardiol 2003;92:10K-16K.
9. Brown M.S., Goldstein J.L – *How LDL Receptors Influence Cholesterol and Atherosclerosis*, Scientific Am, 1985, 251: 52-97.
10. Brown M.S., Goldstein J.L – *Lipoprotein metabolism in the macrophage: implication for cholesterol deposition in atherosclerosis*, Ann Rev Biochem, 1983, 52: 252-61.
11. Burtis C.A., Ashwood E.R. - *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.
12. Cucuianu M., Crîșnic I., Pleșca-Manea Luminița – *Biochimie Clinică – fundamentare fiziopatologică*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1998, 15-79.
13. Devlin T. – *Textbook of Biochemistry*, Ed.3, Wiley- Liss, 1992, 237-358.
14. Durrington P.N. – *How HDL protects against atheroma*, Lancet, 1993, 342: 1315-6.
15. Ernst E., Koenig W. – *Haemoreology, Thrombogenesis and Atherosclerosis*, Semin Thromb Hemost, 1993, 19: 99-103.
16. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias-The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) - European Heart Journal, 2011, 32, 1769–1818.
17. Evans A. – *The French Paradox: Insights from International Epidemiological Studies*, Lipid Review, 1994, 9: 2-4.
18. Fischbach F. – *A Manual of Laboratory Diagnostic Tests*, Ed. 3, Lippincott Company, 1988.
19. Flavahan N.A. – *Atherosclerosis or Lipoprotein – induced Endothelial Dysfunction*, Circulation, 1992, 85: 1927-37.
20. Furchgott R.F.- *The Discovery of Endothelium - Dependent Relaxation*, Circulation, 1993, 87 (suppl V): 3-8.
21. Goga C., Dobreanu D. – *Acizii grași omega- 3*, RRML, 2007, 4 (9), 7-16.
22. Gotto A. M., Amarenco P., Assmann G., et al. – *International Lipid Information Bureau – Dyslipidemia and Coronary Heart Disease*, Ed 3, 2003.
23. Hâncu N. - *Factorii de risc cardiovascular – Dislipidemiile*, Ed. Diab Man, 1995.
24. Heart Protection Study Collaborative Group, *MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering*

- with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial, *Lancet* 2002;360:7-22
25. Hickman T.B., Ronette R.B., Carroll M.D. et al - *Distributions and Trends of Serum Lipid Levels among United States Children and Adolescents Ages 4–19 Years: Data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey*, *Preventive Medicine*, 1998, Vol 27 (6), 879-90.
 26. Howanitz J., Howanitz P. – *Laboratory Medicine*, Churchill Livingstone, 1991, p.173-197.
 27. Jamaluddin MS1, Weakley SM, Yao Q, Chen C., Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease, *Br J Pharmacol.* 2012 Feb;165(3):622-32. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01369.x.
 28. Laker M.F. – *Clinical Biochemistry for Medical Students*, W.B.Saunders Company, 1996, p.22-42.
 29. Marshall W., Bangert S., Lapsley M. – *Clinical Chemistry*, Ed.7, Mosby, 2012, p. 239-258.
 30. Marshall W., Lapsley M., Day A.P., Ayling R. – *Clinical Biochemistry – Metabolic and Clinical Aspects*, Ed. 3, ELSEVIER, 2014, p.200-213, 702-766.
 31. McClatchey K.D. – *Clinical Laboratory Medicine*, Williams & Wilkins, 1994, p.287-301.
 32. Nelson D., Cox M. – *Lehninger Principles of Biochemistry*, Ed. 4, W.H. Freeman and Company, 2005.
 33. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al, *Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering*, *N Engl J Med.*, 2005;352:29
 34. Pagana K., Pagana T. - *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*, Ed.3, Mosby ELSEVIER, 2006, p. 167-173, 513-519.
 35. Pleșca-Manea L., Cucuianu M., Crîșnic I. – *Biochimie Clinică – fundamentare fiziopatologică*, 2003.
 36. Popescu A., Cristea E., Zamfirescu-Gheorghiu M. – *Biochimie medicală*, Ed. Medicală, 2000.
 37. Ray KK, Morrow D.A. et al. *Intensive statin therapy reduces CRP in acute coronary syndrome patients with metabolic abnormalities and adverse lifestyle features: an analysis from PROVE IT-TIMI 22*. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:247A.
 38. Ross R., Glomset J.A. – *The pathogenesis of Atherosclerosis*, *New Engl J Med*, 1976, 295: 369-377.
 39. Scanu A.M. – *Lipoprotein (a) – a Genetic Risk factor for Premature Coronary Hear Disease*, *JAMA*, 1992, 267: 3326-3329.
 40. Shah P.K. – *Inflammation and Plaque Vulnerability*, *Cardiovasc Drug Ther*, 2009, 23: 31-40.
 41. Smith C., Marks A.D., Lieberman M. – *Marks' Basic Medical Biochemistry – A Clinical Approach*, Lippincott Williams & Wilkins, Ed2, 2005, p.583-686.
 42. Stainberg D, Garew T.E, Khoo J.C. – *Beyond Cholesterol, Modification of LDL that increase its atherogenicity*, *New Engl J Med*, 1989, 320: 915-924.
 43. Steiner G., Shafir E. – *Primary Hyperlipoproteinemias*, McGrawHill Ed, 1991.
 44. Waters D.D.- *Stabilization of Coronary Atherosclerosis*, Science Press, 1994.

17

Biochimia inimii

Dan Dobreanu, Alina Scridon

Inima este un organ musculo-cavitar funcționând ca un sistem de două pompe așezate în serie, având rolul de a împinge în circulație o cantitate de sânge adecvată necesităților metabolice ale organismului. Pentru a funcționa în acest mod, celulele miocardice sunt celule excitabile, posedând ca și proprietate specifică contractilitatea. Aceasta definește capacitatea celulei miocardice de a genera lucru mecanic prin interacțiunea proteinelor contractile, proces consumator de energie, generată prin intermediul metabolismului miocardic.

17.1 BIOCHIMIA CONTRACȚIEI MIOCARDICE

Miocitele reprezintă celulele contractile miocardice, formând cea mai mare parte din masa miocardului, la om numărul lor fiind în jur de 10^{11} . Au o formă alungită, cu o lungime de 80-120 μm și un diametru de 10-15 μm . Sunt înconjurate de o membrană numită sarcolemă, care delimitează citoplasma (sarcoplasma) conținând nucleu și numeroase organele celulare.

17.1.1 ORGANIZAREA MICROSCOPICĂ A APARATULUI CONTRACTIL

Miofibrilele reprezintă aparatul contractil al celulelor miocardice formând aproximativ 50% din masa celulară. În vecinătatea lor se găsesc **mitocondriile**, formând aproximativ 30% din masa celulelor și având rolul de a furniza pe calea glicolizei aerobe energia necesară pentru contracție.

Examine microscopic miofibrilele prezintă ca și în cazul mușchiului scheletic un **aspect striat**, datorită alternanței unor benzi cu aspect caracteristic:

- **banda A** (întunecată), anizotropă în lumină polarizată și intens colorabilă cu eozină; este bisectată de o bandă mai clară, numită banda H (Hensen), care la rândul ei este bisectată de o bandă întunecată, M (Mittelinien).
- **banda I** (clară), izotropă în lumină polarizată, slab colorabilă cu eozină și bisectată de o linie mai întunecată numită banda Z (Zwischen).

Strierea (bandarea) materialului contractil are la bază interdigitarea dintre două tipuri de filamente; cum în microscopia electronică deosebirea cel mai ușor de surprins între aceste filamente este cea de grosime, ele sunt cunoscute sub denumirea de filamente groase (10-12 μm) și filamente subțiri (5-6 μm).

La nivelul benzii I se găsesc numai filamente subțiri, în timp ce filamentele groase sunt dispuse numai la nivelul benzii A, aici ele fiind în cea mai mare parte întrepătrunse printre filamentele subțiri. Pe secțiune transversală se constată că la nivelul benzii A dispoziția tridimensională a miofilamentelor are un înalt grad de ordonare, fiecare filament gros având în jurul său 6 filamente subțiri și fiecare filament subțire având în jurul său 3 filamente groase (Figura 17.1).

Sarcomerul este unitatea fundamentală de organizare ultrastructurală a aparatului contractil al fibrei miocardice, reprezentând porțiunea delimitată între două benzi Z succesive. Prin urmare un sarcomer este alcătuit din două jumătăți de bandă I la extremități și o bandă A în centru (Figura 17.2). Lungimea sarcomerului este de 1,8-2,2 μm .

17.1.2 ORGANIZAREA ULTRASTRUCTURALĂ A SARCOMERULUI

La nivel ultrastructural sarcomerul cuprinde agregate proteice supramoleculare. Din punctul de vedere al rolului funcțional aceste proteine pot fi grupate în 3 categorii: proteine contractile, proteine reglatoare și proteine structurale.

Proteinele contractile

Miozina constituie principalul element al filamentelor groase, având două componente denumite meromiozine care se obțin experimental prin degradarea enzimatică produsă de tripsină sau chimotripsină (Figura 17.3).

Meromiozina ușoară (light meromyosin - LMM) este situată în porțiunea centrală a miofilamentului, agregându-se cu celelalte lanțuri de meromiozină ușoară pentru formarea filamentului gros.

Meromiozina grea (heavy meromyosin - HMM) formează capătul moleculei de miozină, care se detașează din filamentul gros formând punți transversale cu actina. Meromiozina grea este formată din 2 subfragmente ce se pot izola experimental sub acțiunea enzimatică a papainei:

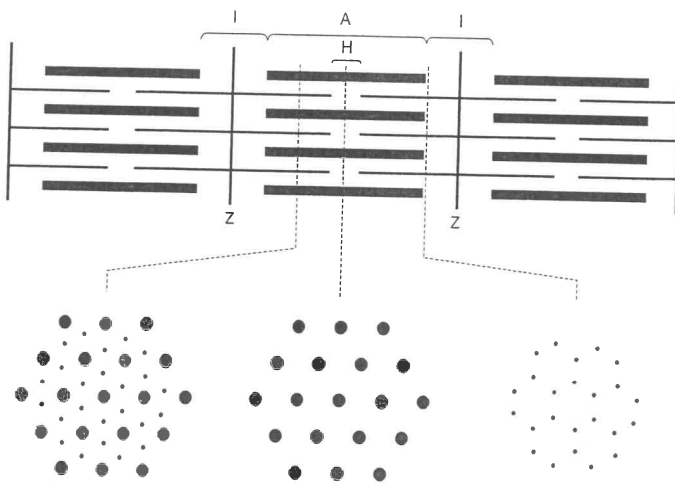


Figura 17.1 Dispoziția filamenților subțiri și groase la nivelul miofibrilelor (după Sabău, 1999)

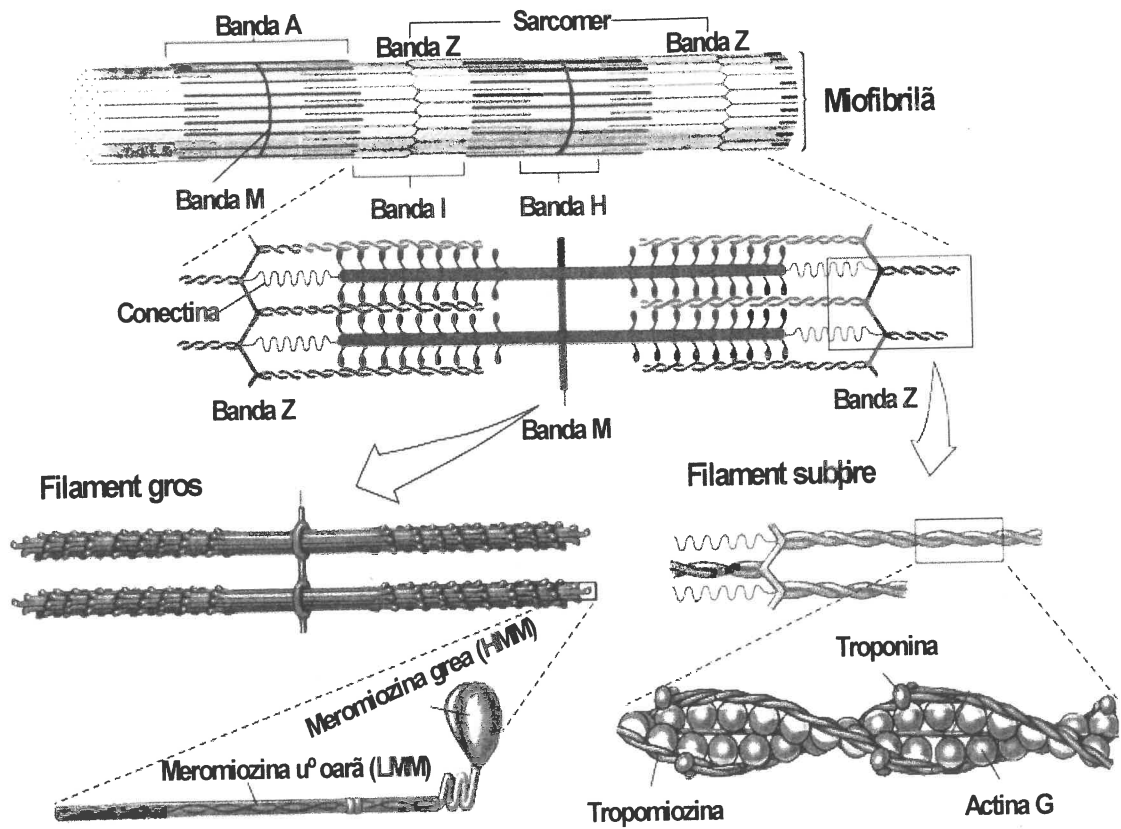


Figura 17.2 Structura sarcomerului la diferite niveluri de organizare (explicațiile în text).

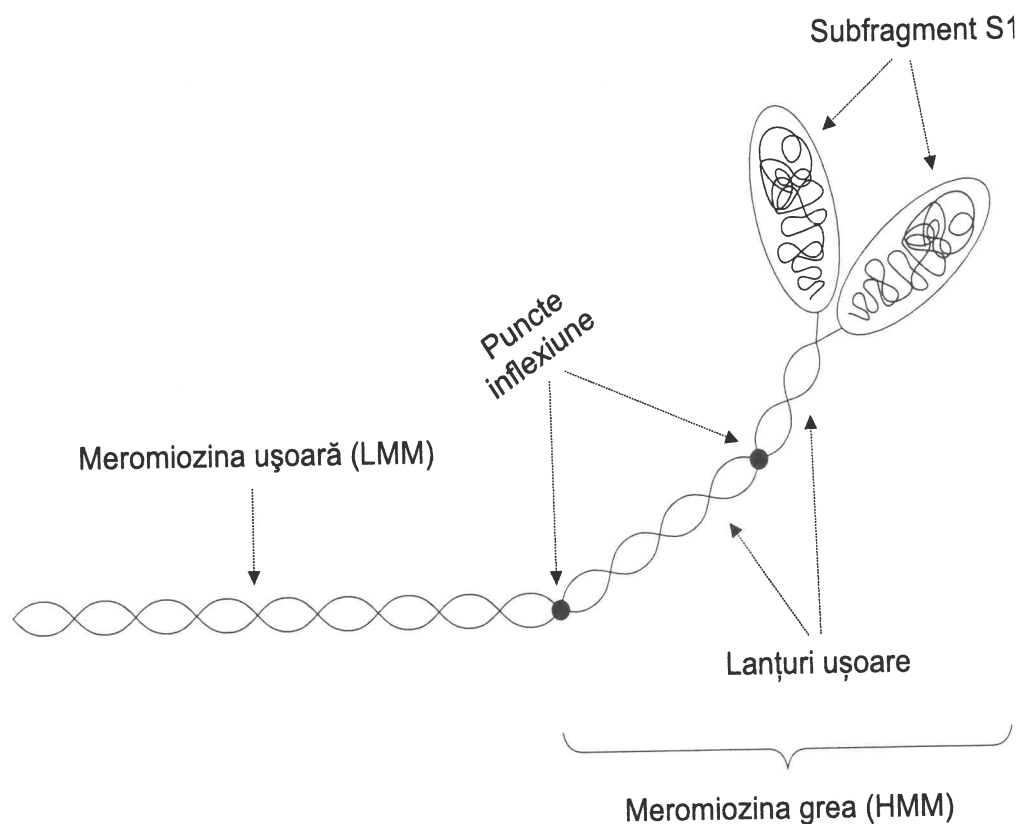


Figura 17.3 Structura miozinei cu porțiunile ușoară (LMM) și grea (HMM), subfragmentele S1 și S2 și punctele de inflexiune (modificat după Katz, 2006)

- **subfragmentul 2 (S2)** formează "brațul" moleculei de miozină cu o structură asemănătoare cu a meromiozinei ușoare
- **subfragmentul 1 (S1)** formează "capul" moleculei de miozină, de formă globulară, la nivelul căruia sunt localizate proprietățile fundamentale ale acesteia: activitatea ATP-azică și capacitatea de a interacționa cu actina.

Din punctul de vedere al alcătuirii polipeptidice, molecula de miozină conține două lanțuri grele și patru lanțuri ușoare.

Lanțurile grele ale miozinei (GM≈200.000 D) spiralate în α -helix, constituie cea mai mare parte a moleculei de miozină. Din punctul de vedere al compoziției în aminoacizi, lanțurile grele ale moleculei de miozină pot fi de două tipuri (α și β), diferite între ele în ce privește viteza activității ATP-azice, mai mare pentru tipul α . După posibilitatea de combinare a celor două tipuri de lanțuri grele există trei **izoenzime miozinice** diferind în ce privește viteza activității ATP-azice: izoenzima V1, formată din 2 lanțuri α , izoenzima V2, formată din un lanț α și unul β , izoenzima V3, formată din 2 lanțuri β .

La nivelul miocardului atrial predomină izoenzima V1, explicând viteza mai mare a contracției la acest nivel, iar în miocardul ventricular tipul de izoenzimă depinde de dimensiunile animalului, la cele mici predominând tipul V1 iar la cele mari tipul V3. La om există o mixtură a izoenzimelor V1, V2 și V3, iar anumite situații patologice determină sinteza preferențială a unei izoenzime sau alteia. De exemplu în cazul hipertrofiei ventriculare se sintetizează preferențial izoenzima V3, permițând o contracție mai economică, ca un adevărat mecanism de adaptare moleculară.

Un aspect important al structurii moleculare a miozinei, considerat cheie în mecanismul contracției, îl reprezintă existența la nivelul lanțurilor polipeptidice grele a două **regiuni de flexibilitate**, datorită absenței la acest nivel a configurației rigide de tip α -helix. Aceste regiuni de flexibilitate corespund punctelor de clivaj sub acțiunea enzimatică a tripsinei și papainei, situându-se ca urmare la nivelul zonei de separare între meromiozina grea și cea ușoară și respectiv la nivelul separației dintre subfragmentele S1 și S2. Datorită existenței acestor regiuni de flexibilitate unghiul dintre componentele miozinei se poate modifica, jucând rol în mecanismul scurtării fibrei miocardice.

Lanțurile ușoare ale miozinei (GM≈20.000 D) sunt dispuse în jurul celor grele în regiunea "gâtului" moleculei de miozină (Figura 17.3). Din punct de vedere funcțional aceste lanțuri sunt incluse în categoria proteinelor "fixatoare de Ca^{+2} " cum sunt troponina C și calmodulina. În multiple țesuturi, inclusiv inima, lanțurile ușoare ale miozinei nu mai leagă Ca^{+2} deoarece unii aminoacizi cheie din structura domeniului fixator de Ca^{+2} au fost eliminați pe parcursul evoluției, dar cu toate acestea ele continuă să joace un rol important în controlul contracției. Nomenclatura lanțurilor ușoare ale miozinei s-a modificat în timp, fiind, din acest motiv destul de confuză. Două lanțuri ușoare sunt considerate **esențiale**, întrucât extracția lor chimică determină denaturarea moleculei de miozină; ele sunt adesea desemnate cu numele de MLC-1 (*myosin light chain-1*). Celelalte două lanțuri ușoare (MLC-2) sunt considerate **reglatoare**, extracția lor nedeterminând inactivarea miozinei. La anumite specii de nevertebrate,

fixarea Ca^{+2} la nivelul MLC-2 joacă rolul esențial în cuplarea excitație-contrație. Chiar dacă la om MLC-2 și-a pierdut capacitatea de fixare a Ca^{+2} , la acest nivel există situsuri de fosforilare pentru diverse proteinkinaze Ca^{+2} -dependente. În mușchiul neted, fosforilarea MLC-2 joacă un rol esențial în declanșarea contracției, în timp ce la nivel miocardic rolul acesteia în controlul forței de contracție este mai puțin bine determinat. Mutații în structura acestor lanțuri întâlnite în anumite forme de cardiomiopatie pot însă altera răspunsul contractil la tahicardie.

Actina reprezintă principalul component al filamentelor subțiri, având un capăt fixat la nivelul membranei Z, în timp ce celălalt alunecă printre filamentele de miozină. Molecula de actină este mult mai mică decât cea de miozină, având o greutate moleculară de aproximativ 42.000 D. De asemenea, spre deosebire de molecula alungită a miozinei, actina este o proteină globulară, având un diametru de $\approx 55 \text{ \AA}$. Ea este stabilă *in vitro* atât sub formă de monomer, denumit **actina G** (globulară), cât și sub forma **actinei F** (fibrilară), forma polimerică caracteristică *in vivo*. Actina fibrilară este formată din 2 lanțuri de monomeri care se răsucesc în helix, punctele de inflexiune fiind plasate pe distanța a 7 monomeri de actină, la intervale de 35-40 nm (Figura 17.4). Funcțional, actina prezintă două proprietăți importante pentru contracția musculară: capacitatea de interacțiune reversibilă cu miozina și posibilitatea de activare a ATP-azei miozinice.

Proteinele reglatoare

Tropomiozina este o moleculă sub formă de filament, având o lungime de aproximativ 400 \AA . Are o structură dublu helicoidală, fiind formată din două lanțuri polipeptidice unite prin punți disulfidice care asigură rigiditatea structurii. Din punctul de vedere al secvenței polipeptidice a lanțurilor, au fost identificate două izoforme numite α - și β -tropomiozină,

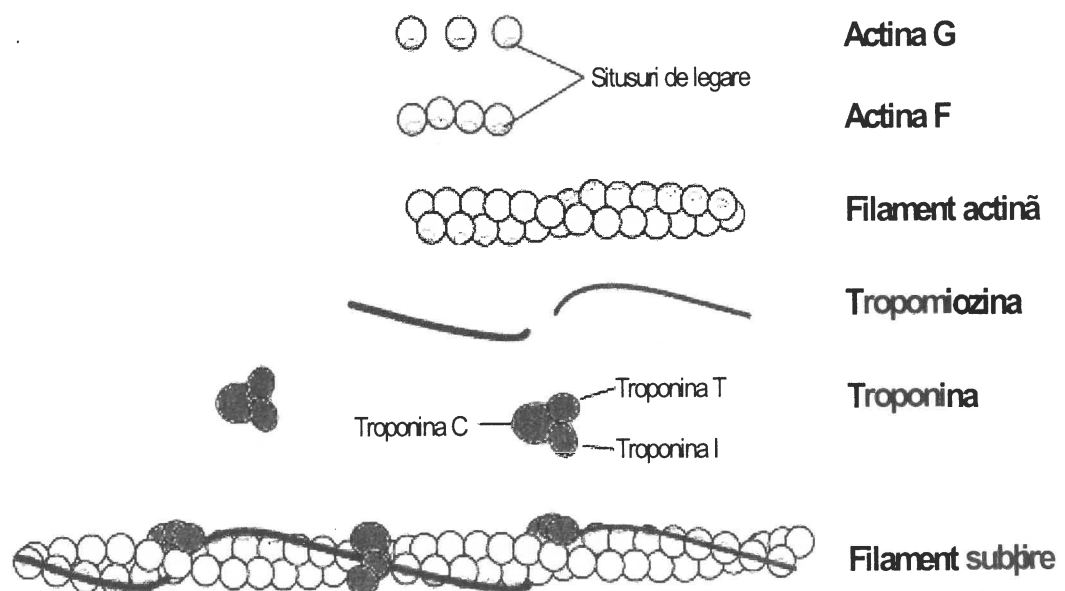


Figura 17.4 Organizarea moleculară a filamentelor subțiri.

având greutatea moleculară de 34.000 D respectiv 36.000 D, molecula de tropomiozină fiind un homo- sau heterodimer al celor două izoforme. În structura sarcomerului, tropomiozina este situată longitudinal în șanțul dintre cele două lanțuri spiralate de F-actină, lungimea filamentului de tropomiozină corespunzând unei bucle a helixului de F-actină. În această poziție, tropomiozina contribuie la rigiditatea structurală a filamentului subțire și, cel mai important, prin cooperarea cu celelalte proteine reglatoare, controlează posibilitatea de interacțiune dintre actină și miozină.

Troponina este un complex format din trei proteine, asociat filamentelor subțiri de actină, fiind localizat la nivelul punctelor de inflexiune ale acestora.

Troponina C face parte din familia proteinelor fixatoare de Ca^{+2} alături de calmodulină și lanțurile ușoare de miozină. Caracteristică structurii acestor proteine este prezența a două regiuni spiralate în α -helix separate de o secvență non-helicală. La acest nivel, aranjamentul unor aminoacizi conținând oxigen formează o adevărată "pungă" la nivelul căreia ionul de Ca^{+2} este fixat cu foarte mare afinitate.

Troponina I este o proteină cu greutate moleculară de aproximativ 23.000 D funcționând în cooperare cu tropomiozina ca un inhibitor al interacțiunii dintre actină și miozină. Resturile de serină din molecula troponinei I pot servi ca situs de fosforilare pentru proteinkinaza A, stare în care generează interacțiuni cooperative care determină reducerea afinității pentru calciu a troponinei C; acest efect accelerează relaxarea atunci când inima este influențată de β -agoniști.

Troponina T, cea mai mare dintre cele trei molecule de troponină, este o moleculă asimetrică funcționând ca un liant care fixează componentele filamentului subțire una de alta. Există un mare număr de izoforme ale troponinei T, numai patru dintre ele fiind identificate în inima umană normală. Cu toate că troponina T nu fixează Ca^{+2} , efectele sale alosterice asupra filamentului subțire influențează sensibilitatea pentru Ca^{+2} și posibilitatea dezvoltării tensiunii. Aceasta explică de ce tranziția de la o izoformă a troponinei T la alta poate modifica contractilitatea miocardică.

Rolul complexului troponină-tropomiozină este acela de a realiza controlul interacțiunii dintre actină și miozină și deci al contracției miocardice (Figura 17.5):

- în stare de **relaxare**, la o concentrație scăzută a Ca^{+2} intracelular, troponina C nu fixează Ca^{+2} și ca urmare tropomiozina ocupă între filamentele subțiri de actină o poziție de blocare care împiedică steric interacțiunea dintre actină și miozină.
- în timpul **contracției**, declanșată prin creșterea Ca^{+2} intracelular, prin legarea acestuia de troponina C se produce o modificare a conformației moleculare determinând deplasarea tropomiozinei din poziția inițială; această nouă poziție face posibilă interacțiunea dintre actină și miozină prin expunerea locului de fixare a miozinei de pe suprafața G-actinei; ca urmare, se poate considera că în mecanismul contracției Ca^{+2} are un **efect derepresor**, împiedicând mecanismele care nu permit interacțiunea dintre actină și miozină.

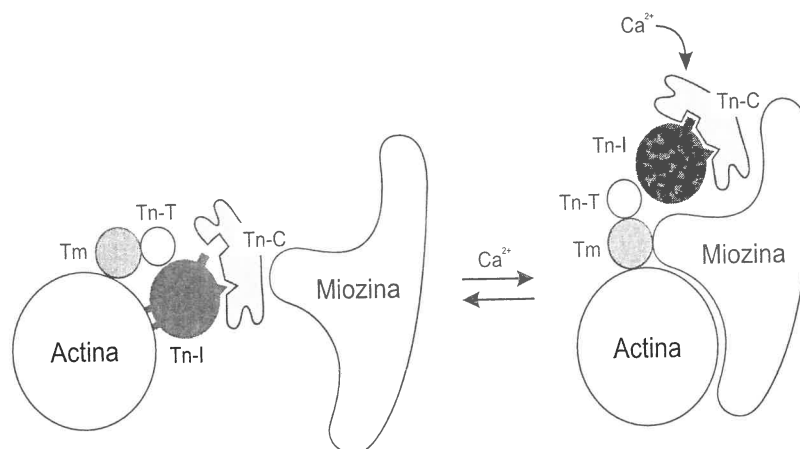


Figura 17.5 Efectul Ca^{+2} asupra interacțiunii dintre actină și miozină mediat prin intermediul proteinelor reglatoare (explicațiile în text).

17.1.3 MECANISMUL CONTRACȚIEI MIOCARDICE

Dacă troponina și tropomiozina sunt responsabile de reglarea contracției miocardice în funcție de disponibilul de Ca^{+2} intracelular, în ce privește mecanismul scurtării propriu-zise a fibrelor miocardice, teoria cea mai acceptată actualmente este cea a **punților transversale**, propusă de Huxley (1957). În esență, această teorie susține formarea și desfacerea repetitivă-ciclică a unor punți transversale între filamentele subțiri de actină și cele groase de miozină, realizate prin intermediul subfragmentului S1 al meromiozinei grele.

Secvența în care se realizează aceste fenomene este următoarea (Figura 17.6):

- “capul” S1 al meromiozinei care conține fixat ADP și fosfat anorganic poate interacționa cu o actină prin legături de tip electrostatic, situsul de fixare fiind însă în condiții de repaus mascat de tropomiozină. Fixarea Ca^{+2} la nivelul troponinei C duce la o modificare conformațională care permite interacțiunea dintre actină și miozină, urmată de modificarea unghiului dintre “capul” și “gâtul” moleculei de miozină la nivelul regiunii de flexibilitate de la acest nivel. Această modificare a unghiului tracționează actina spre mijlocul sarcomerului, realizând așa-numitul **mecanism glisant**.
- formarea legăturii dintre actină și miozină este urmată de eliberarea ADP-ului și a fosfatului anorganic de la nivelul capului miozinic. Pentru desfacerea legăturii actină-miozină este însă necesară fixarea pe capul S1 a moleculei de miozină a unei molecule de ATP; dacă acest ATP nu este disponibil (ischemia miocardică) desfacerea legăturii acto-miozinice nu se poate realiza, apărând așa-numita **contractură ischemică**. Dacă ATP-ul este însă disponibil, el se fixează la nivelul subfragmentului S1 al moleculei de miozină, care se detașează de actină; datorită activității ATP-azice a subfragmentului S1 al miozinei ATP-ul este scindat cu generare de ADP și fosfat anorganic.
- fenomenul continuă atâta timp cât concentrația Ca^{+2} la nivelul sarcomerului

se menține ridicată, complexul troponină-tropomiozină permițând realizarea interacțiunii dintre actină și miozină. Prin succesiunea repetitivă a formării și desfacerii punților transversale acto-miozinice se produce alunecarea filamentelor subțiri în interiorul discurilor întunecate, având ca efect scurtarea sarcomerului.

Proteinele structurale (Figura 17.7)

Cuprind numeroase tipuri de proteine, unele insuficient caracterizate, care deși nu participă în mod direct la contracție, au un rol important în dezvoltarea forței la nivelul sarcomerului prin poziționarea și fixarea elementelor contractile. După localizarea lor la nivelul sarcomerului, au fost descrise trei grupe de proteine structurale: cele atașate filamentelor groase, filamentelor subțiri și liniei Z.

Cel puțin cinci proteine structurale au fost identificate la nivelul filamentelor groase. Cea mai importantă proteină de acest fel este **conectina** (titin), prin intermediul căreia fila-

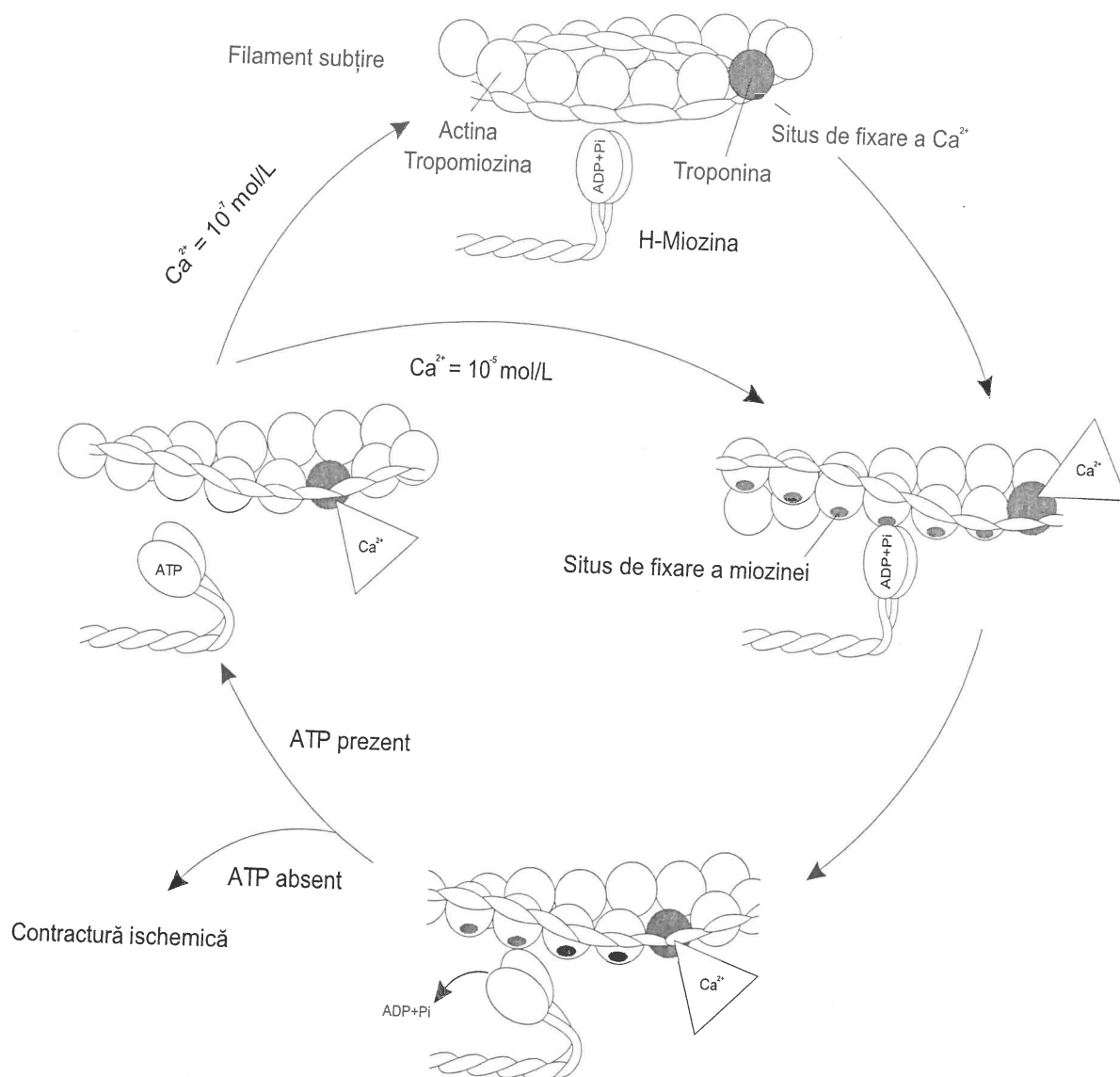


Figura 17.6 Secvența fenomenelor prin care se realizează contracția miocardică (după Bullock, 1994)

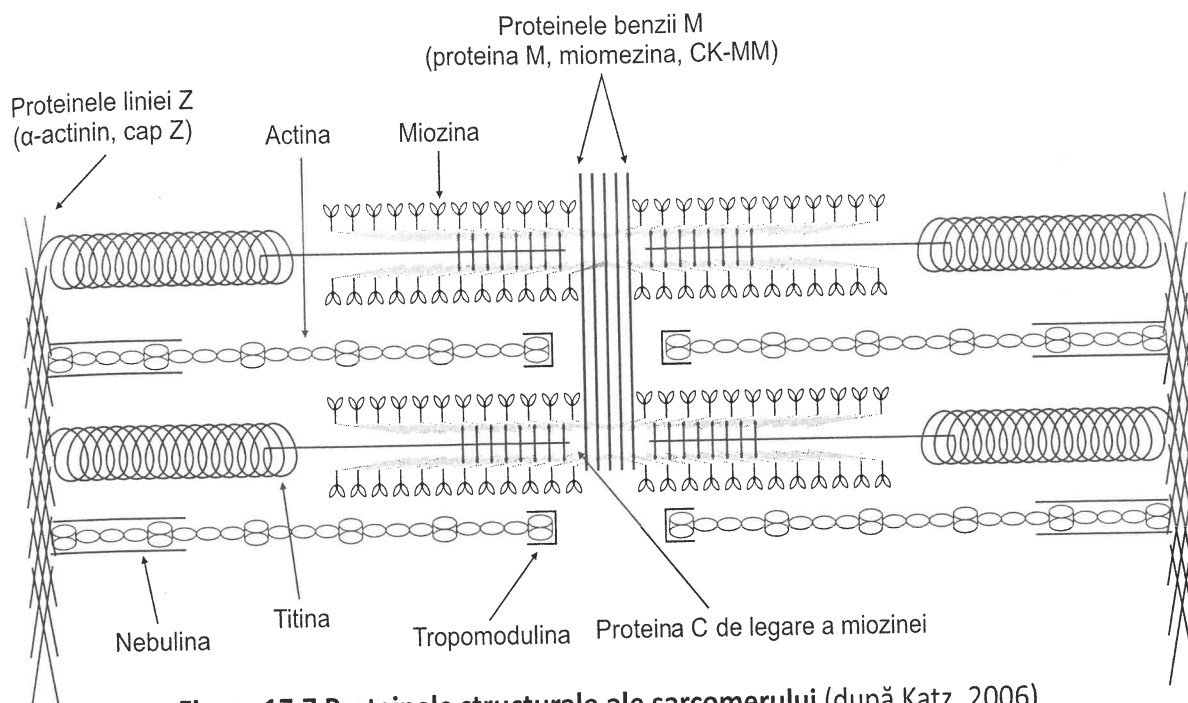


Figura 17.7 Proteinele structurale ale sarcomerului (după Katz, 2006)

filamentele groase de miozină se fixează la nivelul liniei Z. Este o proteină fibrilară cu greutate moleculară foarte mare (≈ 3.000 kD), formată din două segmente distincte, unul inextensibil, de ancorare, și altul extensibil, elastic. Pentru întinderi moderate ale sarcomerului (sub $2 \mu\text{m}$), segmentul elastic se întinde, pentru ca la întinderi mari acesta să se pună în tensiune. Acest comportament este responsabil de relația lungime-tensiune pasivă a fibrei miocardice. **Myosin binding protein C** leagă conectina de filamentele groase, prezentând o serie de situsuri de fosforilare care au rol în reglarea contractilității. Mutații în structura acestei proteine sunt asociate cu unele forme de cardiomiopatie hipertrofică. La nivelul benzii M se găsesc **proteina M** și **miomezina**, care stabilizează filamentele groase, având probabil rol și în miofibrilogeneză. O altă proteină, izoforma **MM a creatinfosfokinazei**, se află de asemenea la nivelul benzii M.

La nivelul filamentelor subțiri s-a identificat o proteină înrudită cu **nebulina** de la nivelul mușchiului scheletic, ce se întinde de-a lungul axului filamentelor subțiri, din spre linia Z în spre interiorul benzii I. **Tropomodulina** este o proteină „capișon” ce se găsește la capetele filamentului subțire, acoperind capătul polimerului de F-actină și fiind responsabilă de lungimea filamentului subțire.

La nivelul liniei Z se găsesc **α -actinina** și **cap Z** (numită și **β -actinină**), ambele înrudite cu tropomodulina și fiind fixate la terminarea filamentelor subțiri în interiorul liniei Z.

17.2 METABOLISMUL MIOCARDIC

17.2.1 PARTICULARITĂȚI ALE METABOLISMULUI MIOCARDIC

Față de metabolismul mușchiului scheletic, metabolismul miocardic prezintă o serie de particularități rezultând din diferențele în funcționarea celor două categorii de mușchi. Astfel, mușchiul scheletic dezvoltă forță în mod exploziv într-un interval de timp scurt, urmată

de o perioadă lungă de relaxare, în timp ce miocardul dezvoltă forță ritmic, dar în mod continuu. Ca urmare, mușchiul scheletic prezintă un metabolism predominant anaerob, având posibilitatea ca în timpul activității să furnizeze energia în mod rapid, prin acumularea așa-numitei "datorii de O_2 " (o cantitate de acid lactic formată în mușchi ca urmare a glicolizei anaerobe și care va fi metabolizat apoi în repaus prin glicoliză aerobă). Miocardul în schimb, neavând o fază de relaxare prelungită, nu are nici posibilitatea de a acumula datorie de O_2 , metabolismul său fiind predominant aerob. Datorită acestui fapt miocardul prezintă o serie de adaptări legate de:

- **posibilitatea de aport a O_2** ; la nivelul miocardului, coeficientul de extracție al O_2 din sângele arterial este foarte mare (50-75% față de 25% la nivelul circulației sistemice), sângele venos coronarian având o saturație relativ scăzută de O_2 . Acesta face imposibilă o creștere a coeficientului de extracție în cazul unei suprasolicitări, miocardul fiind extrem de sensibil la tulburările circulației coronariene. În plus, celula miocardică conține cantități mari de mioglobină, cromoproteină asemănătoare hemoglobinei, care poate stoca anumite cantități de O_2 la acest nivel.
- **substratul energetic folosit**; față de mușchiul scheletic care folosește preferențial glucoza și care are și variantă de metabolism anaerob, pentru miocard substratul energetic preferențial este reprezentat de acizii grași, care prin degradare furnizează o mare cantitate de energie, având însă metabolism exclusiv aerob.
- **echipamentul enzimatic**; datorită metabolismului său, miocardul are foarte bine dezvoltate enzimele ciclului Krebs și ale fosforilării oxidative; cum acestea sunt localizate exclusiv mitocondrial, miocardul este foarte bogat în aceste organite celulare, care ocupă aproximativ 30% din volumul celular.

17.2.2 UTILIZAREA SUBSTRATELOR ENERGETICE DE CĂTRE MIOCARD (FIGURA 17.8)

Producerea energiei se face prin degradarea substratelor metabolice, miocardul putând utiliza în acest scop acizi grași (AG), glucoza, lactatul și în mai mică măsură, corpii cetonic și aminoacizi. Înainte de a fi utilizați de celula miocardică, AG și glucoza pot fi stocați la acest nivel sub formă de trigliceride, respectiv glicogen; depozitele sunt însă mici, miocardul fiind dependent de aportul permanent de substanțe energetice, realizat prin circulația coronariană.

Pentru fiecare categorie de substrat energetic este importantă atât **valoarea energetică** (cantitatea de energie produsă prin degradare) cât și **costul energetic** (consumul de O_2 necesar pentru degradare). Astfel, AG furnizează prin degradare cea mai mare cantitate de energie, aceasta făcându-se însă cu un consum mare de O_2 ; glucoza furnizează o cantitate mai mică de energie dar într-un mod mai eficient, având și varianta de metabolizare anaerobă. Din acest motiv ponderea diverselor substraturi energetice în miocard diferă în funcție de condiții.

17.2.2.1 Metabolismul acizilor grași

Acizii grași (AG) reprezintă în condiții normale principalul substrat energetic folosit de miocard. Ei provin din **trigliceridele** plasmatic, hidrolizate sub acțiunea **lipoproteinlipazei**; miocardul conține de asemenea depozite de trigliceride, care pot fi hidrolizate în AG.

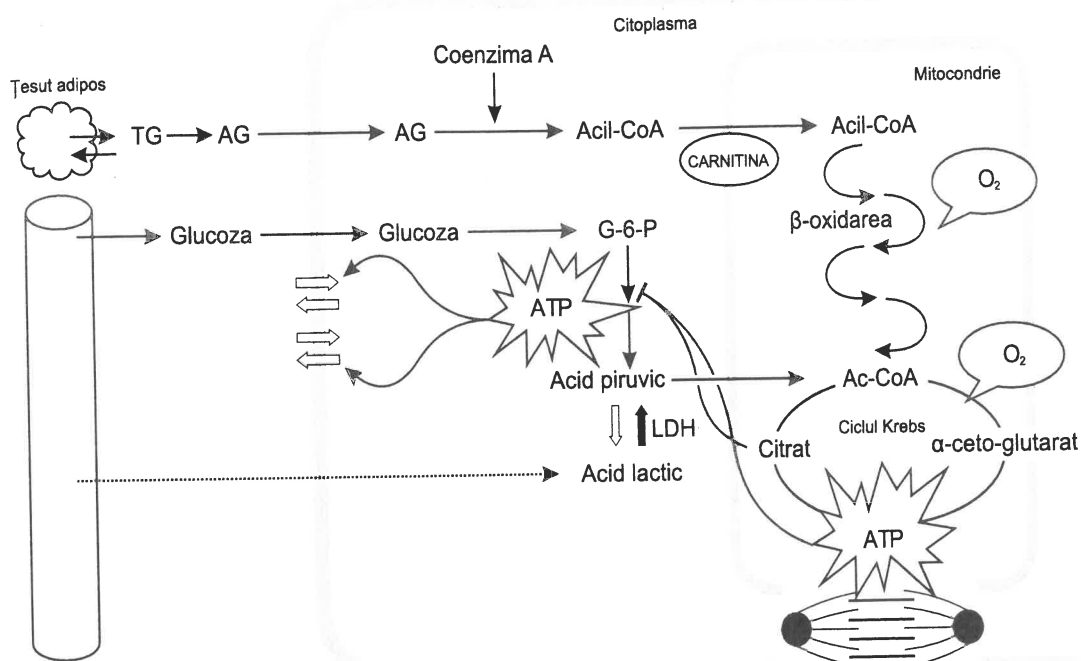


Figura 17.8 Prezentarea schematică a principalelor căi metabolice active în mod normal la nivelul celulei miocardice (explicațiile în text)

Captarea AG de către țesuturi, inclusiv miocardul, se face pasiv, pe baza diferențelor de concentrație, fiind extrem de rapidă, cu un timp de înjumătățire al AG plasmatici de aproximativ 2 minute.

În celula miocardică, AG formează un complex cu **coenzima A** (CoA) rezultând **Acil-CoA**, forma activă metabolic a AG. Enzimele degradării Acil-CoA sunt localizate strict intramitocondrial, pentru metabolizarea acestora fiind deci necesar transferul prin membrana mitocondrială. Acest transfer se realizează numai după legarea grupării acil de **carnitină** (aminoacid cu 7 atomi de carbon), care joacă rolul unui "cărăuș" care transportă AG în mitocondrie, necesitând prezența unei transferaze localizate la nivelul membranei mitocondriale. În mitocondrie AG sunt degradați pe **calea beta-oxidării**, care îndepărtează succesiv din lanțul lung de atomi de carbon al acizilor grași fragmente **Acetil-CoA** cu doi atomi de carbon; aceste fragmente vor fi degradate ulterior pe calea ciclului Krebs.

Procesul de beta-oxidare necesită aport permanent de O_2 , concentrație optimă de AG în interiorul celulei, precum și prezența unor coenzime de tipul NAD^+ , care pe parcursul reacției sunt convertite în forma redusă NADH. Niveluri crescute de coenzimă în formă redusă, precum și niveluri crescute de acetil-CoA intramitocondrial inhibă beta-oxidarea. De reținut că AG nu pot produce energie în absența oxigenului, spre deosebire de metabolismul glucozei cel al AG neavând variantă anaerobă.

17.2.2.2 Metabolismul glucozei

Glucoza reprezintă de asemenea un substrat energetic important pentru miocard, mai ales în condiții de hipoxie. Ea ajunge în sânge prin aport exogen, pătrunderea în celula miocardică făcându-se printr-un mecanism de transport facilitat, activat hormonal.

În celula miocardică, glucoza este fosforilată sub acțiunea **hexokinazei**, formându-se **glucozo-6-fosfat** (G-6-P), forma activă biologic a glucozei. Insulina activează hexokinaza, activând prin aceasta indirect pătrunderea glucozei în celulă, în timp ce produsul de reacție (G-6-P) inhibă hexokinaza.

Metabolismul intracelular al glucozei pornește de la G-6-P, putând urma 3 căi metabolice:

- degradare parțială pe calea ciclului pentozofosfaților, cale puțin activă în miocard în condiții normale.
- sinteza de glicogen, forma de depozit a glucozei, cale este de asemenea puțin activă în mod normal în miocard, unde depozitele de glicogen sunt reduse.
- glicoliza anaerobă, în care G-6-P este degradată printr-o succesiune de reacții enzimatică până la stadiul de **piruvat**. Reacțiile au loc în totalitate în citoplasmă, soldându-se cu un câștig net de 2 molecule de ATP; ele sunt controlate metabolic, glicoliza anaerobă fiind inhibată de ATP și creatinfosfat și stimulată de ADP. Citratul produs pe calea ciclului Krebs inhibă de asemenea glicoliza aerobă prin acțiune asupra unor enzime cheie ale acesteia.

17.2.2.3 Metabolismul lactatului și piruvatului

Piruvatul este produsul final al glicolizei anaerobe, căile metabolice pe care acesta le va urma depinzând de posibilitatea aportului de O_2 :

- în condițiile **metabolismului aerob**, așa cum este în mod normal cel miocardic, piruvatul pătrunde în mitocondrie unde, sub acțiunea piruvat-dehidrogenazei, este oxidat și apoi transformat în acetil-CoA, care pătrunde în ciclul Krebs. Reacția este controlată prin feed-back negativ de nivelul acetil-CoA din mitocondrie și de raportul ATP/ADP (ATP-ul inhibă, iar ADP-ul stimulează activarea piruvatului).
- în condiții de **hipoxie** piruvatul este redus, cu formare de lactat, aceasta fiind calea metabolică predominantă în mușchiul scheletic în activitate, acesta având un metabolism predominant anaerob. Caracteristică pentru miocard este posibilitatea de a folosi ca substrat energetic lactatul produs din abundență la nivelul musculaturii scheletice. În mod normal, 10-30% din lactatul sanguin este extras de miocard, el fiind oxidat intracitoplasmatic în piruvat sub acțiunea lactat-dehidrogenazei (LDH - izoenzima miocardică), piruvatul fiind metabolizat mai departe pe calea ciclului Krebs.

17.2.2.4 Metabolismul corpiilor cetonice

Corpii cetonici sunt sintetizați la nivelul mitocondriilor ficatului, putând fi folosiți ca sursă energetică de miocard mai ales în condiții de inaniție, când glucoza este utilizată preferențial de țesuturile dependente de acest substrat energetic (hematie, creier). Prin degradarea corpiilor cetonice rezultă de asemenea acetil-CoA, care intră în ciclul Krebs.

17.2.2.5 Ciclul Krebs

Ciclul Krebs (glicoliza aerobă) este calea comună de **degradare a Acetil-CoA** care rezultă din diverse metabolisme intermediare. El are loc exclusiv la nivelul mitocondriei, constând într-un ciclu închis de oxidări și reduceri succesive în care fragmentele Acetil-CoA sunt degradate până la compuși simpli (CO_2 și H_2O) cu generarea finală de ATP pe calea fosforilării oxidative.

Desfășurarea ciclului Krebs necesită consum de O_2 , punctul cheie al controlului acestuia constituindu-l transformarea **citrat** → **alfa-cetoglutarat**. Reacția este inhibată de ATP și stimulată de ADP, generând un mecanism de feed-back negativ care controlează activitatea ciclul Krebs în funcție nivelul ATP-ului generat. Acumularea de citrat inhibă glicoliza anaerobă, scăzând alimentarea întregului ciclu cu Acetil-CoA pe această cale.

17.2.3 CONTROLUL METABOLISMULUI MIOCARDIC

Utilizarea optimă de către miocard a substratelor energetice este controlată de mecanisme asigurând integrarea atât la nivelul organismului cât și la nivelul funcției celulare.

La **nivelul organismului** integrarea metabolismului miocardic este **controlată hormonal**, putând fi influențată de:

- disponibilitatea diferitelor substrate plasmatice (AG, glucoză). Nivelul trigliceridelor plasmatice crește sub efectul hormonilor care stimulează lipoliza în țesutul adipos (catecolamine, glucagon, glucocorticoizi) și scade datorită efectului insulinei, care stimulează lipogeneza; în plus, catecolaminele cresc degradarea trigliceridelor în AG prin stimularea directă a lipoproteinlipazei.
- viteza de intrare a substratelor în celula miocardică, atât indirect prin influențarea concentrațiilor lor plasmatice și a utilizării lor de celula miocardică, cât și direct în cazul existenței unui mecanism de transfer hormono-sensibil (glucoza).
- degradarea substratelor în celula miocardică, activitatea unor enzime din diferitele căi metabolice fiind hormono-dependentă.
- utilizarea energiei în procese fiziologice miocardice, activitatea pompelor ionice și mecanismele implicate în contracția miocardică fiind puternic influențate de diverși hormoni.

La **nivel celular** se realizează un **control homeostatic**, atât prin efectul de feed-back al unor produși de reacție, cât și prin echilibrul necesităților energetice celulare exprimat prin raportul ATP/ADP.

De exemplu, în condițiile unui metabolism cardiac normal, cu aport adecvat de O_2 , ponderea cea mai mare în generarea energiei miocardice o au AG, glicoliza anaerobă fiind suprimată de citratul rezultat în secvența ciclului Krebs, ca și de nivelurile mari de ATP generate prin glicoliză aerobă.

Pe termen mediu acest control este completat de **modificarea expresiei genice** prin intermediul **PPAR** (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*; figura 17.9). Denumirea provine de la capacitatea fibraților (medicamente hipolipemiante) ca prin fixare pe acești receptori să determine proliferarea peroxizomilor în ficatul de șobolan. De fapt, PPAR sunt factori de

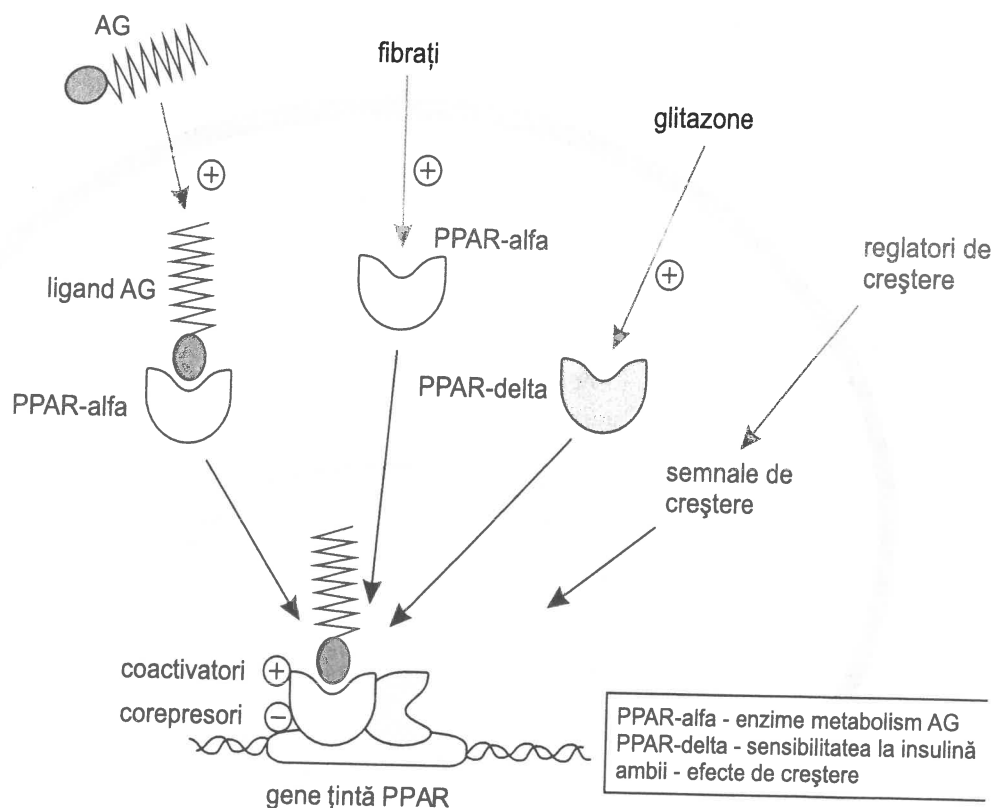


Figura 17.9 Modificarea expresiei genice prin intermediul PPAR în controlul metabolismului. (explicațiile în text) (modificat după Opie, 2004)

transcripție nucleară ce pot fi activați de diverși liganzi, prezentând mai multe izoforme. La nivelul inimii este prevalentă izoforma α , având rolul major de a produce gene care reglează oxidarea AG. Se creează astfel un model de reglare metacrină: AG cu lanțuri lungi de atomi de carbon funcționează ca liganzi ce activează PPAR- α , care interacționând dimerizând cu un alt receptor nuclear, receptorul retinoid (RXR – *Retinoid X Receptor*), activează transcripția genelor țintă. Fiziologic, genele rezultate din activarea PPAR- α codifică enzimele implicate în aproape fiecare etapă a utilizării AG, inclusiv β -oxidarea acestora. Supraexpresia PPAR- α crește oxidarea AG și diminuează captarea și utilizarea glucozei ca substrat energetic, de o manieră celei întâlnite în diabet. În miocardul hipertrofiat în schimb se produce o reducere a expresiei PPAR- α , diminuând utilizarea AG ca substrat energetic și favorizând folosirea glucozei ca și substrat mai economic.

17.2.4 UTILIZAREA ENERGIEI DE CĂTRE MIOCARD

O parte din ATP-ul generat în urma proceselor metabolice celulare este folosit pentru sinteza de **creatinfosfat** prin fosforilarea creatinei sub acțiunea creatinfosfokinazei (CPK) citoplasmatică și mitocondriale. Creatinfosfatul îndeplinește funcție de "tampon" pentru menținerea concentrației ATP în condițiile în care necesarul energetic crește rapid, energia și molecula fosfat din structura sa servind pentru transformarea ADP în ATP.

Cea mai mare parte a ATP-ului este însă folosită la nivel celular ca și furnizor de energie servind pentru:

- sinteză proteică în procesele de reparare și regenerare celulară
- activitatea pompelor ionice, care din punct de vedere metabolic sunt ATP-aze (ATP-aza $\text{Na}^+\text{-K}^+$ dependentă, ATP-aza Ca^{+2} dependentă), efectul lor fiziologic fiind activitatea electrică a celulei miocardice
- interacțiune **actină-miozină**, dependentă la nivel metabolic de ATP-aza miozinică, efectul fiziologic fiind contractia celulei miocardice.

Referitor la utilizarea energiei de către miocard, a fost chiar emisă o **ipoteză a compartimentării funcționale** a energiei miocardice, conform căreia ATP-ul rezultat intracitoplasmatic pe calea glicolizei anaerobe este folosit preferențial pentru procesele de transport ionic transmembranar și susținerea funcției membranelor celulare, în timp ce ATP-ul rezultat intramitocondrial pe calea ciclului Krebs este cel folosit preferențial în funcția contractilă a miocardului.

17.2.5 EXPLORAREA METABOLISMULUI MIOCARDIC

Explorarea metabolismului miocardic poate fi realizată în condiții clinice cu ajutorul spectroscopiei în rezonanță magnetică nucleară (SRMN), a tomografiei emise cu pozitroni (PET) sau a scintigrafiei cu trăsori emițători de fotoni unici (SPECT).

17.2.5.1 Spectroscopia în RMN

Folosește proprietățile de spin ale nucleilor aflați într-un câmp magnetic putând evalua concentrația unor produși metabolici tisulari și modificările suferite de aceștia în diferite situații experimentale sau clinice.

Principiu fizic. Nucleii unor elemente posedă momente magnetice ce rezultă din mișcarea particulelor subnucleare încărcate în timp ce nucleul se rotește în jurul axei sale. Ca urmare aceștia se comportă ca niște mici magneți, care plasați într-un câmp magnetic uniform se orientează de-a lungul axei acestui câmp, iar la întreruperea câmpului magnetic se reorientează spontan, eliberând energie. Frecvența acestui semnal este diferită în funcție de tipul atomului căruia îi aparține nucleul, iar amplitudinea semnalului pentru fiecare domeniu de frecvență depinde de numărul nucleilor de acel tip. Astfel, analiza matematică a semnalului eliberat după aplicarea câmpului magnetic permite obținerea de informații despre concentrația diferiților produși metabolici miocardici.

Utilizare clinică. Un număr de nuclei ai unor molecule implicate în procese biologice au proprietăți fizice care permit utilizarea lor în tehnicile de SRMN. Cea mai frecvent utilizată substanță este P^{31} , folosită pentru măsurarea concentrației ATP și produșilor săi de degradare (ADP), a creatinfosfaților sau a fosfaților anorganici. Deși larg aplicată în condiții experimentale, SRMN este abia la începutul utilizării sale clinice, mai ales datorită dificultății de a obține spectre din miocard fără interferențe cu țesuturile din jur, a mișcărilor inimii și mai ales a lipsei specificității unor modificări metabolice în diferite stări patologice.

17.2.5.2 Tomografia prin emisie de pozitroni

Este o tehnică de imagistică care folosește izotopi emițători de pozitroni încorporați în diverși compuși organici, imaginea fiind creată în corelație cu numărul de pozitroni emiși din zona respectivă a miocardului, permițând estimarea preluării acestor compuși de țesutul miocardic.

Principiu fizic. Pozitronii sunt particule cu masa egală cu a electronului dar cu sarcină pozitivă, care eliberați din nucleu interacționează cu electroni orbitali pierzându-și energia cinetică și dând naștere la o pereche de fotoni, emiși în direcții diametral opuse, aceștia din urmă putând fi detectați de un sistem adecvat. Se poate localiza astfel distribuția substanțelor marcate cu izotopi emițători de protoni la nivelul miocardului.

Utilizare clinică. Perfuzia miocardică poate fi studiată folosind NH_3 marcat cu N^{13} , în timp ce studiul captării **glucozei marcate cu F^{18}** sau a **acidului palmitic marcat cu C^{14}** sunt folosite pentru definirea sursei energetice preferențiale a miocardului.

17.2.5.3 Scintigrafia cu trasori emițători de fotoni unici

Deoarece miocardul extrage preferențial AG cu lanțuri lungi de atomi de carbon, marcarea acestora cu trasori radioactivi permite studiul repartizării acestora în miocard și a curbei lor de clearance. Pentru studiul metabolismului miocardic cu ajutorul tehnicilor scintigrafice se folosesc **AG marcați cu I^{123}** , care injectați intravenos se acumulează rapid la nivelul miocardului, curba de clearance evoluând bifazic, cu o fază rapidă ce corespunde β -oxidării AG și una lentă corespunzătoare preluării acestora de rezervorul lipidic endogen.

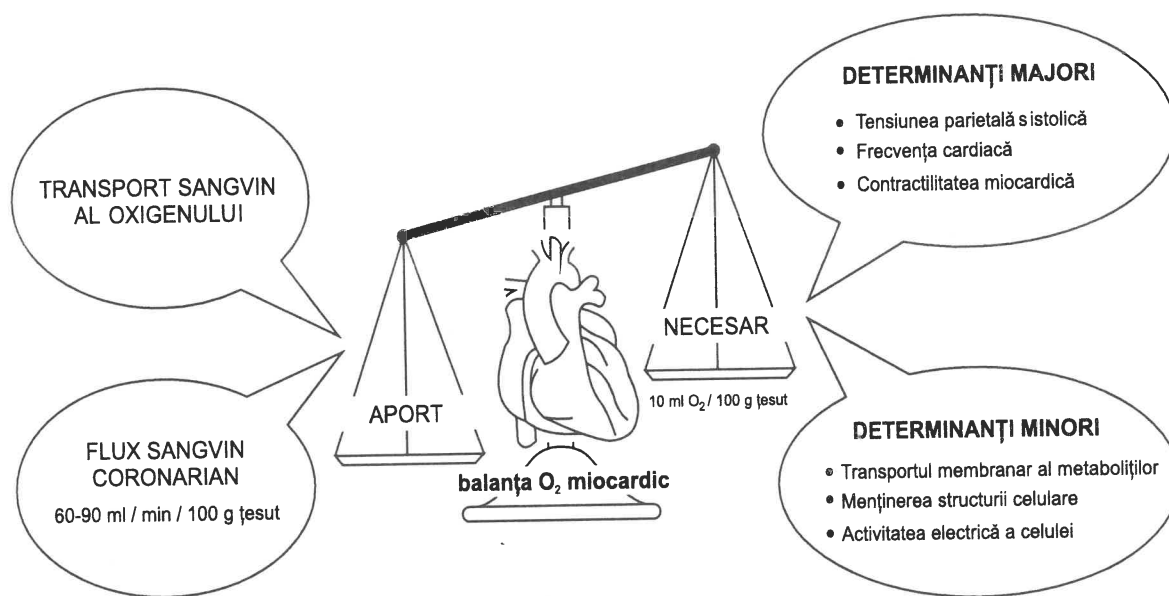
17.3 ISCHEMIA MIOCARDICĂ

Ischemia miocardică (*gr. ischo=prea puțin, haima=sânge*) desemnează un flux sanguin coronarian insuficient față de necesitățile metabolice ale miocardului la un moment dat. Principala consecință a ischemiei este **hipoxia**, adică un aport insuficient de O_2 , care însă poate apare și în alte situații (de exemplu anemia, sau afecțiuni respiratorii). Spre deosebire însă de ischemie, în hipoxie fără alterarea fluxului coronarian, posibilitatea de „spălare” a metaboliților acumulați la nivel miocardic este păstrată.

Esența ischemiei miocardice o constituie alterarea balanței dintre necesarul și aportul miocardic de O_2 (Figura 17.10).

Necesarul miocardic de O_2 este estimat a fi de aproximativ **10 ml O_2 /100 g țesut/minut**. La o greutate a inimii de aproximativ 250-300 g, necesarul de O_2 al cordului întreg este de 25-30 ml de O_2 /minut. O serie de factori ținând de gradul de activitate a inimii pot modifica însă semnificativ acest necesar.

Aportul miocardic de O_2 este realizat de circulația coronariană, fiind egal cu produsul dintre fluxul sanguin coronarian și coeficientul de extracție al O_2 din sângele coronarian. Așa cum s-a menționat, datorită metabolismului miocardic preferențial aerob, miocardul realizează în condiții bazale o extracție maximă a O_2 din sângele arterial, coeficientul de extracție fiind de aproximativ 70-75% (12 ml O_2 /100 ml sânge). În condițiile creșterii necesarului miocardic de O_2 , această extracție nu mai poate fi crescută, astfel încât adaptarea se realizează în această situație în exclusivitate prin modificarea fluxului sanguin coronarian.

Figura 17.10 Balanța O₂ miocardic

Fluxul sanguin coronarian reprezintă aproximativ 4-5% din debitul cardiac, fiind în jur de 300 ml/minut sau **60-90 ml/minut/100 g de țesut**. Aceste valori pot crește de 4-5 ori în condiții de efort, ceea ce arată că fluxul sanguin miocardic la inima normală cu coronare intacte nu constituie factorul limitativ al metabolismului miocardic. În cazul reducerii activității mecanice și a necesităților metabolice, viabilitatea miocardului poate fi menținută și la un flux de 10-20 ml/min sau chiar în absența fluxului pentru o perioadă de până la 100 min, așa cum se întâmplă în timpul hipotermiei, practică pentru intervențiile chirurgicale pe cord.

Modificările metabolismului miocardic în ischemie sunt variabile în funcție de gradul acesteia.

Ischemia ușoară-medie

Este caracterizată metabolic prin accentuarea glicolizei anaerobe în detrimentul utilizării AG ca și substrat energetic.

Mecanismele de reglare metabolică prin care se realizează aceasta pornesc de la încetinirea ciclului Krebs datorită hipoxiei, scăzând astfel producția de ATP și citrat, cu acumularea de acetyl-CoA; acesta suprimă β -oxidarea AG, cale metabolică care consumă cantități importante de O₂.

Scăderea producției de ATP și citrat înlătură inhibiția pe care acești compuși o realizau asupra glicolizei anaerobe, această cale metabolică fiind activată. Funcționarea insuficientă a ciclului Krebs produce acumulare de lactați alături de alți metaboliți acizi, care însă mai pot fi "spălați" de circulația coronariană încă existentă.

Ca urmare, în ischemia ușoară glicoliza anaerobă produce mici cantități de ATP folosite preferențial pentru susținerea funcției membranei celulare și cu conservarea viabilității celulei, în timp ce reducerea oxidării mitocondriale determină scăderea funcției contractile, conservând energetica celulară (Figura 17.11).

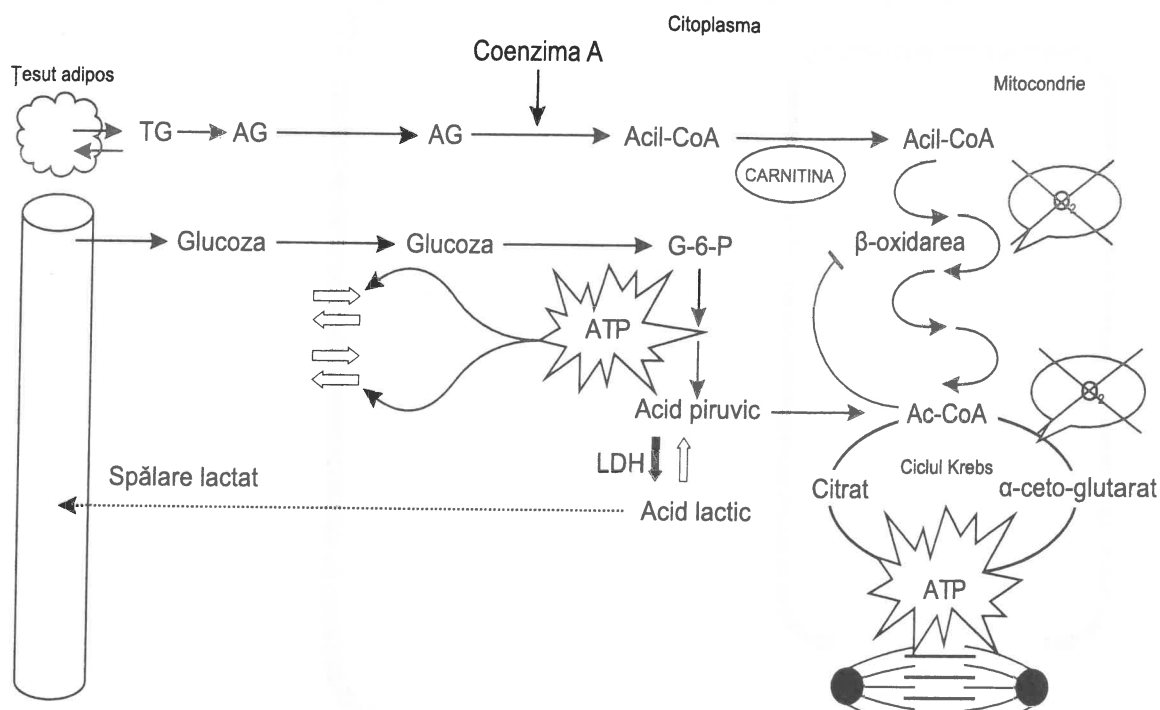


Figura 17.11 Prezentarea schematică a principalelor căi metabolice funcționale la nivelul celulei miocardice în ischemia ușoară-moderată (explicațiile în text)

Ischemia severă

Se caracterizează din punct de vedere metabolic prin suprimarea glicolizei.

Momentul tranziției de la ischemia medie la cea severă ține de posibilitatea “spălării” metaboliților acizi de circulația coronariană încă existentă. Atunci când acești metaboliți nu mai pot fi înlăturați, acumularea acestora duce la scăderea pH-ului, cu inhibiția completă a glicolizei care reduce drastic nivelul de ATP. Imposibilitatea menținerii activității pompelor ionice duce la alterarea severă a fenomenelor electrice celulare, cu acumulare intracelulară de Ca^{+2} și moarte celulară.

Pierderea integrității membranei celulare duce la eliberarea în plasmă a unor constituenți celulari (troponina T) sau enzime intracelulare (lactatdehidrogenaza, creatinkinaza), dozarea concentrației acestora fiind folosită ca un indicator al severității leziunilor ischemice (Figura 17.12).

Cunoașterea modificărilor biochimice care au loc în ischemia miocardică a permis conceperea de terapii care să acționeze la acest nivel, dintre care se pot menționa:

- administrarea de soluții “repolarizante” conținând glucoză și insulină, cu scopul de a furniza miocardului substratul pentru glicoliza anaerobă, favorizând totodată captarea acestuia în celulă și utilizarea lui pe această cale metabolică
- folosirea trimetazidinei sau ranolazinei, compuși care acționând la nivel enzimatic asupra 3-cetoacil CoA tiolazei inhibă β -oxidarea AG, favorizând obținerea energiei pe calea mai economică a glicolizei anaerobe

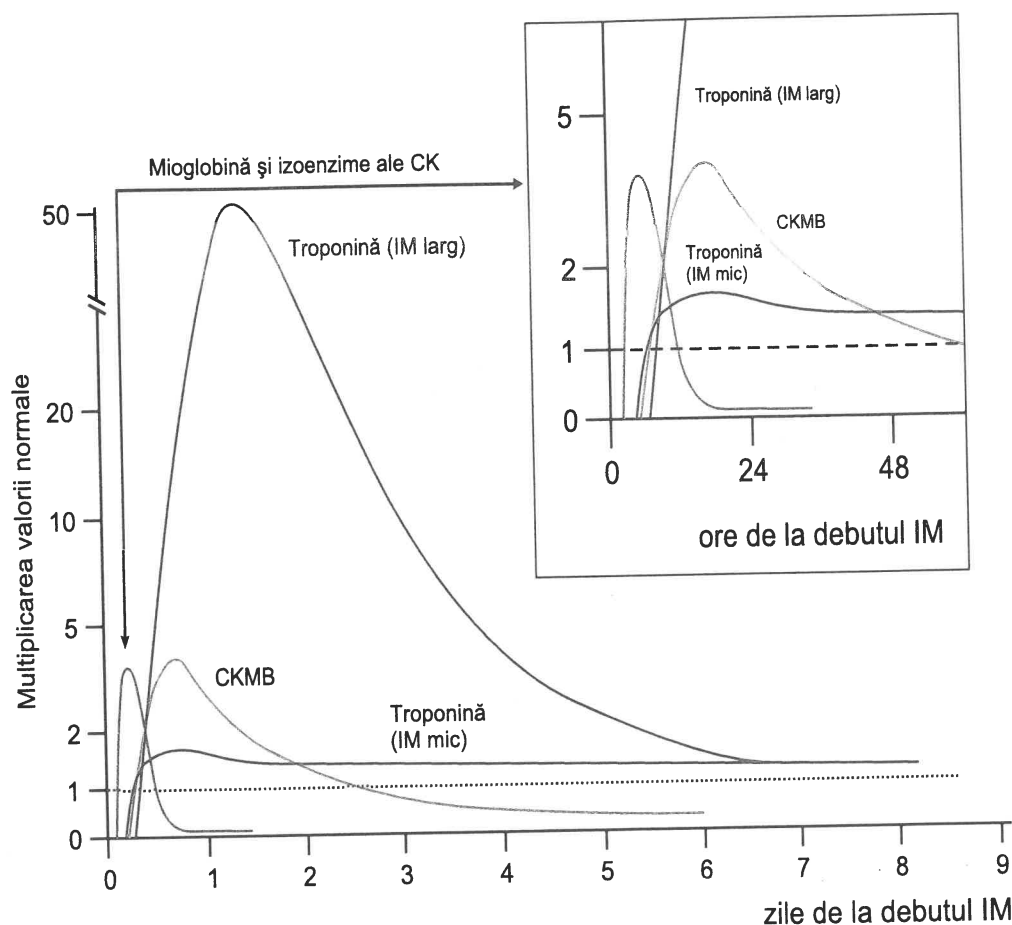


Figura 17.12 Dinamica plasmatică a principalilor markeri de citoliză miocardică, folosiți pentru diagnosticul și monitorizarea infarctului miocardic acut

- administrarea de coenzimă Q, care stabilizează membranele celulare mediind transferul de electroni la nivel citocromic

Deși atractive din punct de vedere conceptual, beneficiile reale ale unor asemenea terapii în practică mai trebuie încă evaluate.

17.3.1 MIOCARDUL HIBERNANT

Conceptul de miocard hibernant definește un miocard hipoperfuzat, cu contractilitate diminuată, dar care are capacitatea de a-și recupera funcția contractilă în condițiile restabilirii fluxului coronarian.

Din punct de vedere metabolic, miocardul hibernant este caracterizat prin suprimarea β -oxidării AG, cu menținerea însă funcțională a glicolizei anaerobe care asigură aportul energetic minimal pentru păstrarea integrității membranelor celulare.

Evidențierea miocardului hibernant reprezintă un deziderat important în era tehnicilor de revascularizație miocardică, el fiind una din țintele terapeutice cărora li se adresează aceste proceduri. Există mai multe metode de investigație care permit punerea în evidență a miocardului hibernant:

- **ecocardiografia cu dobutamină** permite evidențierea unor zone hipokinetice, care își ameliorează contractilitatea după dobutamină, reprezentând plauzibil miocard hibernant
- **scintigrafia miocardică**, cu Th^{201} sau Tc^{99} (preparatul comercial care este injectat cuprinde izotopul fixat complexat cu 6 molecule de ligand methoxyisobutylisonitrile –SESTA MIBI) permite evidențierea zonelor care fixează tardiv izotopul, spre deosebire de captarea normală sau de miocardul necrotic care nu-l fixează deloc.
- **tomografia prin emisie de pozitroni (PET)** este tehnica de elecție pentru evidențierea miocardului hibernant corespunzător zonelor care captează mai puternic glucoza (marcată cu F^{18}), comparativ cu fluxul coronarian estimat cu $^{13}\text{NH}_3$ (Figura 17.13).

17.3.2 PRECONDIȚIONAREA MIOCARDICĂ

Constă în creșterea toleranței la ischemie a miocardului care a suferit anterior episoade de ischemie tranzitorie.

Mecanismul acestui fenomen este incomplet precizat, unul din mediatorii implicați fiind **adenozina** produsă în timpul episoadelor de ischemie tranzitorie. Acționând asupra unor receptori miocardici specifici (tipul A_1 și A_3), ea produce deschiderea canalelor de K^+ sensibile la ATP de la nivelul sarcolemei și membranei mitocondriale, limitând acumularea Ca^{+2} cu efect nociv, dar și sinteza de proteine intracelulare, probabil implicate în preconditionarea pe termen lung a miocardului.

17.3.3 REPERFUZIA MIOCARDICĂ

Datorită dezvoltării tehnicilor de revascularizație coronariană (medicamentoasă, intervențională sau chirurgicală), în ultimii ani se acordă o importanță tot mai mare modificărilor care

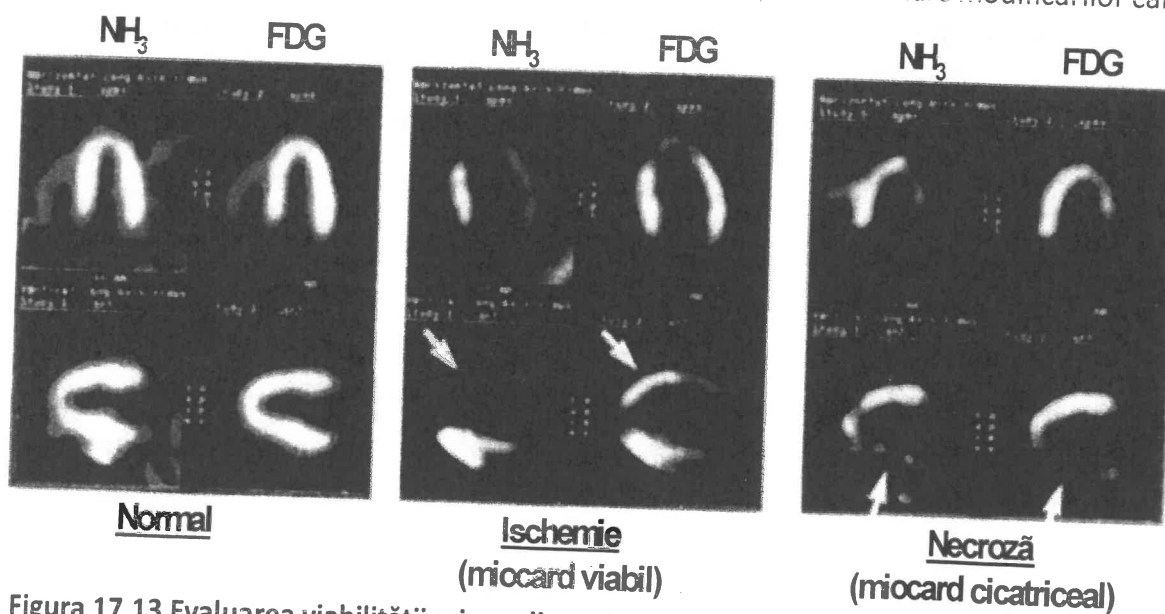


Figura 17.13 Evaluarea viabilității miocardice prin tehnica PET. În cazul miocardului ischemic acesta are un flux coronarian scăzut, captând deficitar $^{13}\text{NH}_3$, dar își păstrează capacitatea de a metaboliza glucoza, captând fluorodeoxiglucoza (FDG). În cazul miocardului necrotic alterarea fluxului coronarian este însoțită de suprimarea metabolismului glucidic (după Braunwald, 2004).

apar la nivelul miocardului ischemic după restabilirea fluxului coronarian, constatându-se că reperfuzia miocardică poate să inducă leziuni de severitate variabilă, mergând până la moartea celulară.

Mecanismul leziunilor de reperfuzie cuprinde două modificări biochimice importante, care se întrețin reciproc, formând un adevărat cerc vicios: **generarea în exces de radicali liberi de O_2 și acumulare de Ca^{+2} intracelular.**

Radicalii liberi de O_2 sunt prezenți în mod fiziologic în celulă, cel mai important fiind **anionul superoxid**, un atom de O_2 având un electron suplimentar pe ultimul orbital. El reprezintă forma activă a O_2 , sub care acesta intră în toate reacțiile biologice, concentrația lui fiind menținută în mod fiziologic la niveluri foarte scăzute sub acțiunea unor sisteme enzimatice care îl neutralizează (de exemplu citocromoxidaza mitocondrială).

În ischemie este stimulată formarea de anion superoxid din O_2 rămas disponibil, prin mai multe mecanisme: creșterea activității xantinoxidazei din celulele endoteliale, activarea neutrofilelor, autooxidarea catecolaminelor, activarea cascadei acidului arahidonic. Pe de altă parte, în ischemie și activitatea citocromoxidazei este redusă semnificativ.

Reperfuzia cu aport de O_2 duce la formare în exces de radicali superoxid, cu efect toxic (**paradoxul oxigenului**). Acumularea radicalilor liberi de O_2 produce peroxidarea lipidelor și inactivarea enzimelor, aceste modificări nefiind totdeauna suficiente pentru moartea celulară, dar producând alterări ale funcției celulare pe mai multe căi (Figura 17.14):

- afectarea sarcolemei cu creșterea permeabilității pentru Ca^{+2} , datorită funcționării inadecvate a ATP-azei Ca^{+2} -dependente și ATP-azei Na^+-K^+ -dependente
- afectarea reticulului sarcoplasmatic cu alterarea mecanismului de transport al Ca^{+2} .
- Ambele mecanisme duc la **supraîncărcarea celulară cu Ca^{+2}** care agravează suplimentar leziunile:
- creșterea Ca^{+2} intracelular activează fosfolipazele care accentuează alterarea celulară inițiată de anionii superoxid
- acumularea intramitocondrială a Ca^{+2} scade suplimentar activitatea citocromoxidazei
- alterarea homeostaziei Ca^{+2} determină funcționarea anormală a cuplului electrocontractil
- excesul de Ca^{+2} determină afectarea proteinelor contractile cu scăderea afinității acestora pentru Ca^{+2} și scăderea contractilității.

Expresia clinică a leziunilor de reperfuzie include:

- **aritmii de reperfuzie**, având un mecanism specific, acela al postdepolarizărilor precoce, legat de supraîncărcarea celulară cu Ca^{+2}
- **stunningul miocardic**, disfuncție contractilă reversibilă care apare după restaurarea completă a fluxului sanguin legată de mecanismele biochimice descrise anterior
- **moartea celulară**, fiind demonstrat că datorită mecanismelor lezionale menționate se poate produce necroza unor celule viabile anterior reperfuziei.

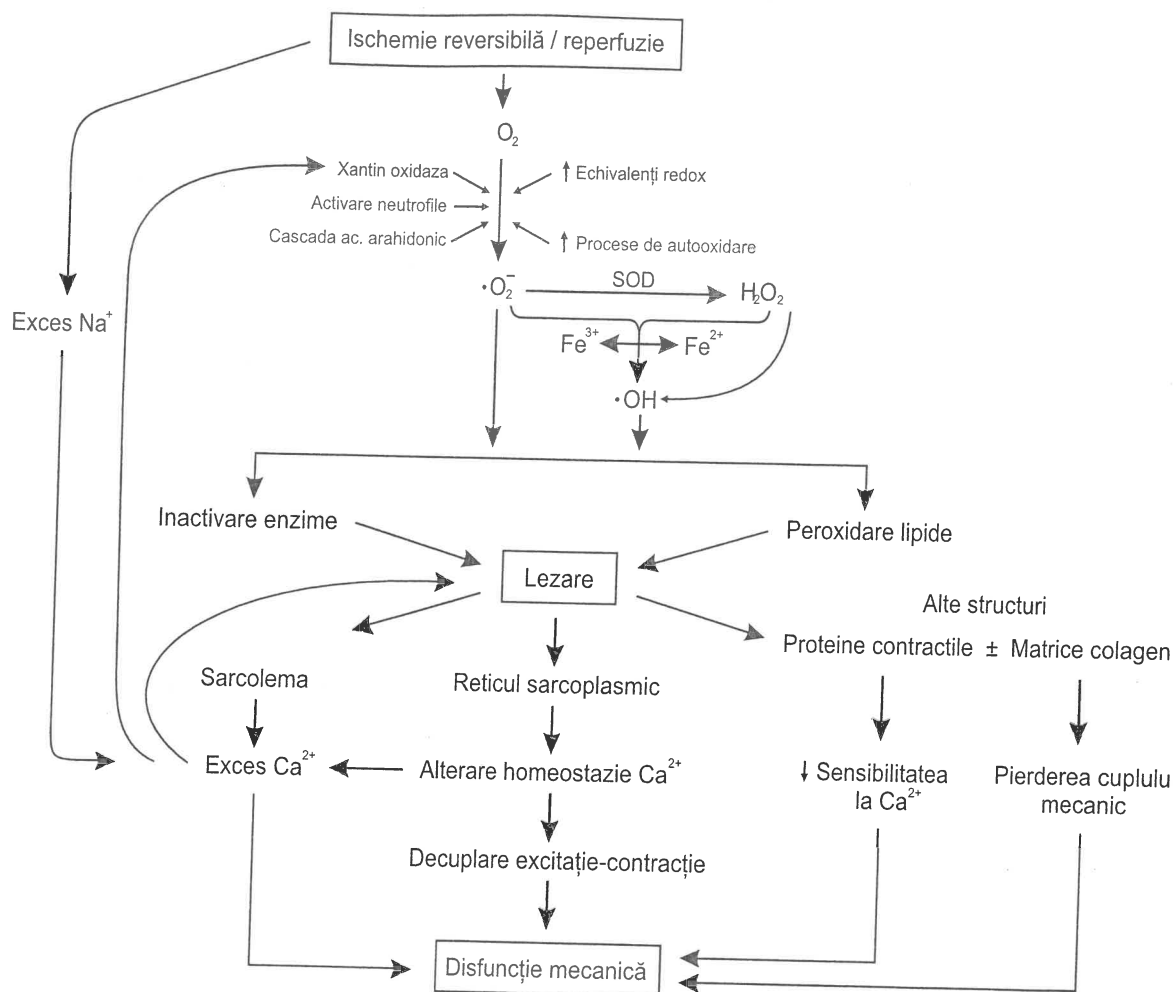


Figura 17.14 Mecanismele implicate în apariția leziunilor miocardice de reperfuzie (după Boli, 1990).

17.4 BIOMARKERII ÎN ISCHEMIA MIOCARDICĂ

În prezența unei injurii miocardice soldate cu întreruperea continuității membranelor cardiomiocitelor, o serie de componente proteice ale celulelor cardiace, numite generic biomarkeri cardiaci, sunt eliberate în torentul circulator. Dozarea prin metode de laborator a acestor componente permite aprecierea prezenței și severității injuriei miocardice, stratificarea riscului și ghidează abordarea terapeutică a acestor pacienți. Includerea unor astfel de markeri în definiția unor patologii precum infarctul miocardic acut (IMA) subliniază utilitatea lor clinică. În ciuda numărului mare de biomarkeri propuși ca rezultat al studiilor clinice, doar o mică parte dintre aceștia au reușit să își confirme utilitatea și să treacă proba timpului. Mai mult decât atât, chiar markerii validați, utilizați curent în practica clinică, au o serie de limitări. Aceasta explică încercările continue de a identifica noi biomarkeri, în special pentru predicția evenimentelor și a mortalității cardiace pe termen lung.

Interesul în identificarea și validarea markerilor de ischemie și necroză miocardică s-a manifestat încă din anii 1980-1990, acești biomarkeri reprezentând în prezent un pilon central în abordarea pacienților prezentați cu suspiciune de ischemie miocardică. Istoria biomarkerilor

de ischemie miocardică începe cu markeri nespecfici, precum aspartat aminotransferaza, lactat dehidrogenaza, mioglobina sau creatinkinaza totală și continuă cu teste mai specifice, incluzând izoenzimele lactat dehidrogenazei sau fracțiunea MB a creatinkinazei (CK-MB). Înlocuirea în cursul anilor 1990 a metodelor clasice, electroforetice, de dozare a CK-MB cu testarea prin metode imunologice, mult mai rapide și mai ieftine, a impus dozarea CK-MB ca standard în evaluarea pacienților cu ischemie miocardică. Cercetările ulterioare au permis identificarea unor markeri cu specificitate și sensibilitate crescute, precum izoformele CK-MB sau troponinele cardiace, a căror dozare este larg accesibilă în prezent, tehnicile moderne permițând inclusiv detectarea unor niveluri extrem de reduse ale acestor markeri, corespunzătoare unor arii de necroză miocardică extrem de reduse.

17.4.1 MIOGLOBINA

Mioglobina, proteină prezentă în celulare musculare scheletice și cardiace, a reprezentat unul dintre markerii timpurii de injurie miocardică. Datorită greutății sale moleculare mici și localizării sale intracitoplasmatică, mioglobina este una dintre componentele proteice eliberate cel mai precoce în torentul circulator în cazul injuriei miocardice, crescând la 1-4 ore de la debutul unui IMA, cu un vârf la 4-12 ore și revenire rapidă la valorile inițiale în decurs de 24-36 de ore. Eliberarea sa în torentul circulator are însă un caracter "pulsatil", fiind frecvent necesară determinarea seriată a mioglobinei. În timp ce eliberarea rapidă a mioglobinei în torentul circulator este un atu al acestui marker, permițând diagnosticul precoce al IMA, dezavantajul său major este reprezentat de lipsa ei de cardiospecificitate, forma cardiacă și cea scheletică fiind identice. Astfel, în afara necrozei miocardice, o serie de afecțiuni neuromusculare și ale musculaturii scheletice, efortul fizic intens, insuficiența renală, injecțiile intramusculare sau intervențiile chirurgicale pot produce creșteri semnificative ale mioglobinei, limitând utilitatea ei în confirmarea diagnosticului de IMA. Mai mult decât atât, într-un număr important de studii sensibilitatea mioglobinei pentru diagnosticarea IMA nu depășește 90% comparativ cu CK-MB, în timp ce comparativ cu nivelurile troponinei sensibilitatea este chiar mai redusă, astfel încât valoarea predictiv negativă a mioglobinei nu este suficient de ridicată pentru a putea exclude cu certitudine un IMA. Dozarea concomitentă a anhidrazei carbonice III, o enzimă predominantă în musculatura scheletică dar slab reprezentată la nivel miocardic, a fost propusă pentru creșterea specificității mioglobinei în identificarea injuriei miocardice, absența nivelurilor crescute de anhidrază carbonică III în prezența unor niveluri crescute de mioglobină putând exclude practic sursa scheletică a acesteia din urmă.

17.4.2 CREATINKINAZA ȘI FRAȚIUNEA MB A ACESTEIA

Creatinkinaza, enzimă dimerică prezentă într-o multitudine de țesuturi ale organismului, inclusiv în miocard, constă din 2 subunități, M și B, prezentând astfel trei izoforme: MM, MB și BB. La nivel miocardic, fracțiunea MB a creatinkinazei reprezintă 20-40% din totalitatea izoformelor de creatinkinază, în timp ce proporția acesteia în musculatura scheletică este de

doar 2-5%. În prezența unor afecțiuni cronice însă, precum insuficiență renală sau miopatii scheletice, proporția CK-MB în musculatura scheletică poate crește până la niveluri de 20%, apropiate de cele observate la nivel miocardic. Pe de altă parte, izoforma MM a creatinkinazei este forma dominantă a enzimei atât la nivel cardiac cât și scheletic. Astfel, este ușor de înțeles că creșterea nivelurilor circulante de creatinkinază totală nu este cardiospecifică, putând însoți un număr mare de alte afecțiuni non-cardiace.

Înainte de identificarea și validarea troponinelor cardiace ca markeri de necroză miocardică, fracțiunea MB a creatinkinazei a reprezentat, pentru o lungă perioadă de timp, standardul de aur în detecția prin metode de laborator a necrozei miocardice. Creșterea CK-MB poate fi observată la 4-6 ore după debutul unui IMA, atingând un vârf la 10-24 de ore și revenind la valorile inițiale în 48-72 de ore. Reducerea relativ precoce a nivelurilor circulante de CK-MB explică utilitatea acesteia în detecția reinfarctizării, prin dozări seriate ale enzimei. Dacă rolul CK-MB în diagnosticul IMA este larg acceptat, utilitatea acestui marker ca factor predictiv de evenimente adverse cardiace și mortalitate rămâne controversată.

Prezența CK-MB în musculatura periferică explică posibilitatea creșterii acesteia și în condiții precum traumatisme musculare, efort fizic intens sau miopatii scheletice. Calcularea indexului CK-MB/creatinkinază totală $\times 100$ a fost propusă ca metodă utilă pentru creșterea specificității CK-MB și elucidarea sursei de CK-MB, cardiacă sau scheletică, un raport CK-MB/creatinkinază totală mai mic de 30% sugerând originea scheletică a izoformei MB, în timp ce un indice mai mare de 50% indică originea cardiacă a enzimei. Valorile cuprinse între 30% și 50% continuă să reprezinte o zonă gri, interpretarea acestor valori fiind extrem de dificilă. Întrucât creșterea izolată a unuia din cei doi parametri poate influența semnificativ valoarea raportului și poate furniza rezultate fals-pozitive, raportul rămâne utilizabil doar la pacienții care prezintă o creștere combinată a ambilor parametri. O serie de studii care au comparat puterea diagnostică a raportului CK-MB/creatinkinază totală față de valoarea absolută a CK-MB au demonstrat creșterea specificității diagnostice prin utilizarea acestui raport, cu o scădere considerabilă însă a sensibilității. Astfel, utilitatea clinică a acestui indice rămâne extrem de limitată, utilizarea sa de rutină nefiind recomandată.

Unul dintre dezavantajele utilizării CK-MB în diagnosticul IMA este creșterea relativ tardivă a acesteia în torentul circulator. Deși tehnicile uzuale de laborator determină CK-MB ca o singură componentă enzimatică, tehnici electroforetice permit identificarea a două izoforme diferite de CK-MB, 1 și 2. În timp ce izoforma 1 este forma plasmatică a enzimei, CK-MB 2 este forma tisulară a acesteia. În cazul unei injurii miocardice, aceasta din urmă este rapid eliberată în torentul circulator, putând fi detectată în ser în primele 2-4 ore de la debutul unui IMA și atingând un vârf la 6-9 ore. Odată ajunsă în torentul circulator, izoforma 2 a CK-MB este convertită sub acțiunea carboxipeptidazei, care clivează aminoacidul terminal al monomerului M al CK-MB, în izoforma circulantă CK-MB 1. Astfel creșterea nivelurilor circulante ale izoformei 2 a CK-MB împreună cu creșterea inițială a raportului CK-MB 2/CK-MB 1 pot fi utile în diagnosticul precoce al IMA, înainte ca creșterea absolută a CK-MB totale să poată fi detectată. Dozarea de rutină a celor două izoforme ale CK-MB este însă împiedicată de complexitatea tehnică a metodei de dozare.

17.4.3 TROPONINELE CARDIACE

Rolul troponinelor cardiace în diagnosticarea IMA a devenit treptat din ce în ce mai important, ele reprezentând în prezent standardul de aur în detectarea necrozei miocardice. Cele trei izoforme ale troponinelor, troponina I, troponina C și troponina T, se găsesc atât la nivel miocardic cât și în musculatura scheletică. În timp ce genele care codifică izoforma scheletică și cea cardiacă ale troponinei C sunt identice, așa încât cele două sunt structural identice și nu pot fi diferențiate, izoformele troponinelor T și I au expresie distinctă în musculatura scheletică față de miocard, ele putând fi diferențiate prin metode imunologice de laborator. Variabile precum lipsa standardizării, utilizarea de anticorpi monoclonali diferiți, prezența unor izoforme modificate de troponină I sau T circulante și posibilitatea unor reacții încrucișate între anticorpii utilizați și diverse forme și subunități circulante ale troponinelor T și I în plasma pacienților cu IMA pot afecta semnificativ sensibilitatea și specificitatea testelor disponibile în prezent. Astfel, familiarizarea personalului medical cu tehnica utilizată în laboratorul propriu reprezintă o cerință importantă pentru optimizarea utilizării acestor markeri.

Izoformele T și I ale troponinelor sunt ambele distribuite în două compartimente intracelulare. Circa 2-4% din cantitatea lor totală se găsește liberă în citoplasmă, în timp ce cea mai mare parte este localizată la nivelul sarcomerului. Astfel, dinamica modificărilor plasmatice ale celor două izoforme este identică, ele crescând la 4-8 ore de la debutul IMA, atingând un vârf la 14-24 de ore și revenind la valorile inițiale în 10-14 zile post-IMA.

În ciuda specificității lor miocardice, creșterea celor două izoforme ale troponinei poate fi consecința unui număr mare de injurii miocardice care nu presupun implicit existența ischemiei miocardice. Astfel de afecțiuni includ miocardita, insuficiența cardiacă, hipertensiunea arterială, contuziile miocardice, insuficiența renală, embolia pulmonară, sepsisul, hemoragia subarahnoidiană, hipovolemia, aritmiile cardiace, intervențiile coronariene percutane sau chirurgicale. De altfel, mecanismul responsabil de creșterea nivelurilor circulante ale troponinelor și în special ale troponinei T la pacienții cu insuficiență renală rămâne incomplet elucidat. Ipoteza inițială care sugera originea în musculatura scheletică a troponinelor în contextul miopatiei asociate a fost infirmată prin studii biochimice care au demonstrat originea miocardică a acestora. Multiple mecanisme, precum prezența de microinfarcte miocardice, a hipertensiunii arteriale sau insuficienței cardiace, frecvent întâlnite la pacienții cu insuficiență renală, ar putea explica, cel puțin parțial, creșterea troponinelor cardiace la acești pacienți. Indiferent de mecanismul responsabil de creșterea troponinelor cardiace la acești pacienți, decizia dacă aceste niveluri sunt indicatoare ale unui IMA sau rezultate fals-pozitive, este frecvent dificilă. Determinarea seriată a troponinelor la intervale de 6-9 ore ar putea reprezenta o bună abordare în cazul pacienților cu probabilitate moderat-crescută a unui IMA, în timp ce la cei cu probabilitate redusă de IMA, valorile troponinei ar trebui considerate mai probabil fals-pozitive.

Dincolo de rolul lor central în diagnosticul IMA, troponinele cardiace reprezintă și importanți markeri de prognostic la acești pacienți, dar și indicatori de eficiență a tehnicilor de perfuzie miocardică în IMA. După o creștere acută a nivelurilor circulante ale troponinelor

ca efect al spălării lor de către fluxul coronarian restabilit, vârful acestora va fi redus ca urmare a reducerii ariei necrotice ca rezultat al revascularizării coronariene eficiente.

17.4.4 MARKERI EMERGENȚI DE ISCHEMIE MIOCARDICĂ

O serie de markeri noi, precum peptidul natriuretic cerebral (BNP), markeri inflamatori precum proteina C reactivă (CRP), interleukina-6, mieloperoxidazele leucocitare, ligandul solubil CD40 exprimat de plachetele sanguine activate, celulele endoteliului vascular și celulele musculare netede ale mediei vasculare, monocite și macrofage, dar și diverși markeri noi de ischemie miocardică precum albumina modificată în ischemie, compus rezultat în urma interacțiunii albuminei circulante cu țesutul miocardic ischemic, izoenzima BB a glicogen fosforilazei, acizii grași liberi circulanți și proteinele lor transportoare, au fost recent propuși pentru evaluarea și stratificarea riscului la pacienți cu ischemie miocardică. BNP, sintetizat de miocardul ventricular ca răspuns la creșterea stresului parietal, este un marker utilizat curent în evaluarea pacienților cu insuficiență cardiacă. O serie de date recente sugerează însă că acest marker ar putea fi de asemenea util în evaluarea pacienților cu ischemie miocardică. Creșterea combinată a troponinei I și a BNP a fost asociată cu dublarea riscului de deces în rândul acestor pacienți, în timp ce asocierea nivelurilor de BNP cu severitatea leziunii responsabile de IMA sugerează că BNP ar putea fi un indicator al severității bolii cardiace ischemice.

17.5 BIOMARKERII ÎN INSUFICIENȚA CARDIACĂ

Pe parcursul ultimilor ani au fost propuși o multitudine de markeri în evaluarea pacienților cu insuficiență cardiacă. Dincolo de markerii clasici, precum BNP sau troponinele cardiace, studiile recente au identificat o serie de markeri noi cu rol potențial în diagnosticarea, stabilirea prognosticului sau ghidarea abordării terapeutice la acești pacienți. Este puțin probabil ca oricare dintre aceștia să permită singur evaluarea exhaustivă a acestei maladii complexe, dar folosirea lor combinată ar putea aduce un real beneficiu clinic.

17.5.1 MARKERI DE DEFORMARE MIOCARDICĂ

BNP și fragmentul N-terminal al prohormonului său (NT-pro-BNP) sunt neurohormoni implicați în reglarea homeostaziei volemice a organismului prin diureză și natriureză. NT-pro-BNP este un polipeptid sintetizat la nivel miocardic în condițiile creșterii stresului parietal. Odată eliberat, acesta este clivat de o endoprotează circulantă în două lanțuri polipeptidice – BNP și fragmentul N-terminal - un peptid fără activitate biologică. La rândul său, BNP promovează vasodilatația arterială, diureza și natriureza și reduce activitatea sistemului nervos simpatic și a sistemului renină-angiotensină-aldosteron, contracaraând astfel principalele mecanisme fiziopatologice observate la pacienții cu insuficiență cardiacă, nivelurile sale circulante reflectând cu fidelitate severitatea disfuncției miocardice. Cu toate acestea, o serie de factori pot influența semnificativ nivelurile circulante ale acestui hormon, făcând uneori dificilă interpretarea sa în condiții clinice. Timpul de înjumătățire al BNP în plasmă este de doar 20 de

minute, eliminarea BNP fiind realizată în cea mai mare parte pe cale renală. Spre deosebire de acesta, NT-pro-BNP are un timp de înjumătățire de 60-90 de minute, eliminarea sa fiind însă tot predominant renală. Astfel, în timp ce factori precum hipervolemia sau hipertensiunea, prin creșterea filtrării glomerulare, pot reduce nivelurile circulante de BNP și NT-pro-BNP, asocierea disfuncției renale se însoțește de creșterea disproporționată a nivelurilor BNP și NT-pro-BNP față de severitatea insuficienței cardiace. O creștere moderată a BNP a fost observată de asemenea odată cu înaintarea în vârstă, probabil în relație directă cu fibroza miocardică și alterarea funcției renale, întâlnite frecvent la această categorie de pacienți. Pe lângă rolul lor în diagnosticul insuficienței cardiace, BNP și precursorul său reprezintă și importanți markeri prognostici la această categorie de pacienți. O serie de alți markeri de deformare miocardică, precum peptidul natriuretic atrial (ANP), adrenomedulina sau fragmentul mijlociu al prohormonului ANP au fost propuși mai recent ca markeri de strain miocardic alături de BNP și NT-pro-BNP. În timp ce ANP și adrenomedulina sunt rapide eliminate din torentul circulator, ceea ce limitează utilitatea lor practică, fragmentul mijlociu al prohormonului ANP persistă în circulație intervale mai lungi de timp, fiind astfel un marker mai fidel în evaluarea insuficienței cardiace.

17.5.2 ALȚI MARKERI

La fel ca și în cazul ischemiei miocardice, **inflamația** a fost frecvent asociată nu doar cu o incidență crescută a episoadelor de decompensare cardiacă, ci și cu un prognostic mai rezervat la această categorie de pacienți. Studiile clinice au demonstrat implicarea certă a procesului inflamator ca și componentă în patogeneza și progresia insuficienței cardiace. Progresia insuficienței cardiace implică activarea cascadei citokinelor ca urmare a unei injurii miocardice inițiale. În timp ce în stadiile inițiale ale bolii aceste citokine par a servi unui proces adaptativ, compensator, producerea excesivă a acestor proteine inflamatorii devine treptat maladaptativă, contribuind la progresia bolii. Astfel, biomarkeri inflamatorii precum CRP, factorul de necroză tumorală α (TNF- α), interleukinele 1, 6 și 18, antigenul-1 al apoptozei și receptorul acestuia, membru al familiei receptorilor TNF- α sau, conform unor studii recente, pentraxin-3, ar putea fi extrem de utili în stratificarea riscului pacienților cu insuficiență cardiacă, dar și în identificarea pacienților asimptomatici la risc de a dezvolta insuficiență cardiacă. Cardiomiocitele supuse injuriei ischemice pot fi ele însele sursa unor citokine proinflamatorii precum interleukinele 1, 6 și 18 sau TNF- α , care vor stimula la rândul lor producția hepatică de CRP. Odată sintetizate, aceste citokine promovează apoptoza cardiomiocitelor, în timp ce factori precum interleukina-6 promovează hipertrofia miocitelor, iar TNF- α induce dilatare ventriculară, printr-un mecanism care implică participarea matrixmetaloproteinazelor.

Stresul oxidativ, reprezentat de dezechilibrul între producerea speciilor reactive de oxigen precum anionul superoxid, peroxidul de hidrogen sau radicalii hidroxil și mecanismele endogene antioxidante, a fost de asemenea incriminat în patogeneza și progresia insuficienței cardiace, crescând totodată riscul proaritmie al acestor pacienți, prin mecanismele mențio-

nate anterior. Evaluarea directă a speciilor reactive de oxigen la om este extrem de dificilă, astfel încât au fost identificați o serie de markeri indirecți de stres oxidativ. Aceștia includ lipoproteinele plasmatiche oxidate cu greutate moleculară mică, malondialdehida, acidul uric sau xantinoxidaza. Nivelurile acestor biomarkeri au fost asociate în numeroase studii clinice cu severitatea insuficienței cardiace, ei fiind totodată confirmați ca markeri predictivi de mortalitate la această categorie de pacienți, independent de alți factori de risc cunoscuți.

Remodelarea ventriculară și în special cea a matricei extracelulare, joacă un rol extrem de important în progresia insuficienței cardiace. Menținerea integrității matricei extracelulare depinde de un echilibru fragil existent între activitatea matrixmetaloproteinazelor, enzime proteolitice care degradează colagenul fibrilar, și cea a inhibitorilor tisulari ai matrixmetaloproteinazelor. Un dezechilibru între cele două componente, caracterizat prin dominanța activității matrixmetaloproteinazelor asupra inhibitorilor tisulari ai acestora, promovează astfel dilatarea și remodelarea ventriculară. Pe de altă parte, creșterea anormală a sintezei de colagen, sugerată de nivelurile circulante crescute ale procolagenului tip I sau III sau ale galectin-3, poate conduce la rândul său la apariția disfuncției miocardice prin fibroza consecutivă. Utilitatea clinică a acestor biomarkeri este însă redusă în acest moment de prezența a cel puțin 15 izoforme de matrixmetaloproteinaze și a mai multor tipuri de inhibitori tisulari ai matrixmetaloproteinazelor, dar și a procolagenului. Studii ulterioare vor permite probabil identificarea subtipurilor cu rol prognostic cert.

O serie de markeri ai **activării neurohormonale** anormale în contextul insuficienței cardiace au fost de asemenea identificați. Această categorie include markeri precum nivelurile plasmatiche sau urinare de norepinefrină, endotelina-1, activitatea reninei plasmatiche, angiotensina II, aldosteronul sau vasopresina. Din păcate, nivelurile circulante ale multora dintre acești hormoni sunt extrem de instabile, ceea ce limitează semnificativ utilitatea lor clinică. Pe de altă parte, participarea lor activă în patogeneza insuficienței cardiace face ca acești compuși să prezinte și potențiale ținte terapeutice, blocanții sistemului renină-angiotensină aldosteron sau a sistemului nervos simpatic reprezentând de altfel baza tratamentului medicamentos al insuficienței cardiace.

Deși markerii de **injurie miocardică** sunt utilizați cu predilecție în evaluarea pacienților prezentați cu ischemie miocardică, utilitatea lor nu este limitată la această categorie de pacienți. Factori precum inflamația, stresul oxidativ sau activarea neurohormonală pot fi de asemenea responsabili de injuria miocardică, explicând astfel creșterea nivelurilor troponinelor cardiace la pacienții cu insuficiență cardiacă, chiar în absența ischemiei miocardice.

Bibliografie selectivă

1. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Physiology*, Mosby-St.Louis, 2004. Ed.5th, pg.305-321.
2. Boli R. Mechanism of myocardial stunning. *Circulation* 82:723-735, 1990.
3. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* 2008; 358(20): 2148-59.
4. Bullock J, Boyle J, Wang M. *Physiology*, Lippincott Williams & Wilkins-Philadelphia, 1994. Ed.2nd,

5. De Silva R, Camici P. Role of positron emission tomography in the investigation of human coronary circulatory function. *Cardiovascular Research* 28:1595-1612, 1994.
6. Depre C, Vanoverschelde JL, Taegtmeyer H. Glucose for the heart. *Circulation* 99:578-588, 1999.
7. Dobreanu, D. *Fiziologia inimii*, University Press-Targu Mures, 2007, pg.123-130.
8. Ferrari R. Metabolic disturbances during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Cardiol* 76:17B-24B, 1995.
9. Iqbal N, Wentworth B, Choudhary R, Landa Ade L, Kipper B, Fard A, Maisel AS. Cardiac biomarkers: new tools for heart failure management. *Cardiovasc Diagn Ther* 2(2): 147-64, 2012.
10. Katz AM. *Physiology of the Heart*, Lippincott Williams & Wilkins-Philadelphia, 2011. Ed.5rd, pg.88-124.
11. Kloner RA, Boli R, Marban E, Reinlib L. Medical and cellular implications of stunning, hibernation and preconditioning. *Circulation* 97:1848-1867, 1998.
12. Knight C, Fox K. From antianginal drugs to myocardial cytoprotective agents. *Am J Cardiol* 76:4B-7B, 1995.
13. Lewandrowski K, Chen A, Januzzi J. Cardiac markers for myocardial infarction. A brief review. *Am J Clin Pathol*, 118 Suppl: S93-9, 2002.
14. Liquori ME, Christenson RH, Collinson PO, Defilippi CR. Cardiac biomarkers in heart failure. *Clin Biochem* 47(6): 327-37, 2014.
15. Opie LH. Cardiac metabolism - emergence, decline and resurgence (Part I). *Cardiovascular Research* 26:721-733, 1992.
16. Opie LH Cardiac metabolism - emergence, decline and resurgence (Part II). *Cardiovascular Research* 26:817-830, 1992.
17. Opie LH. *Heart Physiology - From Cell to Circulation*, Lippincott Williams & Wilkins-Philadelphia, 2004. Ed.4th, pg.306-354.
18. Rahimtoola S. The hibernating myocardium. *Am Heart J* 117:211-221, 1989.
19. Sabău M. *Fiziologia inimii*, University Press-Tîrgu Mures, 1999, pg.259-302.
20. Singh V, Martinezclark P, Pascual M, Shaw ES, O'Neill WW. Cardiac biomarkers – the old and the new: a review. *Coron Artery Dis* 21(4):244-56, 2010.
21. Walker DM, Yellon DM. Ischaemic preconditioning: from mechanisms exploitation. *Cardiovascular Research* 26:734-739, 1992.
22. Yellon, D. The current status of stunning, hibernation and preconditioning. *Cardiovascular Research* 27:886-890, 1993.

18

Receptorii celulari și mecanismele de transducție a semnalului

Alina Scridon

Celulele sunt structuri ale organismului capabile să recepționeze, să integreze și să răspundă adecvat la o multitudine de semnale provenite din mediul înconjurător. Cu toate că unele dintre aceste semnale sunt transmise prin contactul direct dintre celulele învecinate, la nivelul organismelor pluricelulare majoritatea moleculelor semnal sunt sintetizate la distanță de locul lor de acțiune și ulterior transportate prin torentul sanguin până la structurile efectoare. Semnalele astfel declanșate sunt recepționate și procesate prin mecanismele celulare de transducție a semnalului, procese la care participă *receptori specifici, efectori și proteine reglatoare*.

Receptorii celulari sunt molecule proteice specializate situate la nivelul membranelor celulare sau în mediul intracelular, care interacționează specific cu substanțe endogene (hormoni, neurotransmițători, citokine, factori de creștere) sau cu substanțe administrate exogen și care odată activate declanșează un lanț de procese biochimice care au ca rezultat final producerea răspunsului celular adecvat. Acest întreg proces prin care semnalul extern este transformat într-un răspuns celular adecvat poartă numele de *mecanism de transducție a semnalului*.

Ipoteza existenței receptorilor celulari a fost formulată cu mult înainte de existența unor dovezi în acest sens, ca urmare a observațiilor unor cercetători asupra specificității chimice și fiziologice a unor agenți terapeutici. Prima dovadă a existenței acestora a fost furnizată de fiziologul englez John Newport Langley (1889) prin studiile sale asupra mecanismului de acțiune al nicotinei asupra ganglionilor nervoși. Acesta a observat efectul stimulator / inhibitor al nicotinei asupra unor organe inervate de nervi postganglionari prin activarea și respectiv inhibarea joncțiunilor interneurale la nivel ganglionar, dar și faptul că curara este incapabilă să blocheze contracția musculară declanșată electric, blocând însă eficient contracția indusă de nicotină. În aceeași ordine de idei, Paul Ehrlich observa că anumiți agenți organici sintetici prezintă efecte antiparazitare, în timp ce alți agenți nu au același efect, cu toate că diferențele dintre structurile lor chimice sunt minore. Conceptul de mesageri secundari capabili să medieze efectele unor hormoni peptidici a fost inițiat de Earl Wilbur Sutherland Jr., care demonstra în cursul anilor 1960 prezența în spațiul intracelular a adenilatciclazei, o enzimă implicată în conversia adenosin trifosfatului (ATP) în adenosin monofosfat ciclic (AMPC), dar și capacitatea unor hormoni peptidici de a stimula acest proces biochimic.

Ulterior, receptorii celulari au devenit o țintă continuă a cercetărilor. Conceptul de receptor, extins în domeniul endocrinologiei, imunologiei sau biologiei moleculare, s-a dovedit esențial în explicarea unor procese de reglare biologică. Progresele tehnologice au permis descrierea la nivel molecular a receptorilor diferitelor substanțe farmacologic active, deschizând calea pentru înțelegerea bazelor moleculare ale acțiunii acestor agenți. Cercetările recente în acest domeniu au permis descrierea detaliată a proceselor moleculare implicate în transducția semnalelor extracelulare în mesaje intracelulare și a implicării acestora în controlul funcțiilor celulare.

În marea majoritate a cazurilor, transducția transmembranară a semnalului se bazează pe o gamă relativ restrânsă de mecanisme moleculare. Patru mecanisme esențiale în transducția transmembranară a semnalului sunt în prezent bine înțelese. Acestea se bazează pe:

- utilizarea unui ligand liposolubil, care străbate membrana celulară și acționează asupra unui receptor situat intracelular;
- utilizarea unui receptor proteic transmembranar pentru a stimula proteinele G, proteine de transducție a semnalului legate de guanozin trifosfat (GTP), care generează în continuare un mesager secund intracelular;
- utilizarea unui canal ionic transmembranar ligand-dependent a cărui închidere / deschidere poate fi influențată prin atașarea ligandului; și
- utilizarea unui receptor proteic aflat la suprafața celulei, a cărui activitate enzimatică intracelulară este reglată alosteric prin legarea ligandului de un situs al domeniului extracelular al proteinei.

18.1 RECEPTORII CELULARI

Receptorii celulari sunt structuri proteice încorporate în membrana celulară sau dispuse în mediul intracelular, care au capacitatea de a lega una sau mai multe molecule semnal (peptide, neurotransmițători, hormoni, agenți farmacologici sau toxine) cunoscute sub numele de liganzi. La nivelul unei celule pot fi dispuși mai mulți receptori capabili să interacționeze cu un același ligand, legarea ligandului la unul sau altul dintre acești receptori putând activa căi diferite de transducție a semnalului, sau dimpotrivă, liganzi diferiți pot activa o aceeași cale biologică.

În structura fiecărui receptor pot fi descrise cel puțin două structuri esențiale: un situs de recunoaștere și legare a ligandului (situsul de legare) și un situs efector, implicat în producerea răspunsului celular. Atașarea ligandului la situsul specific de legare induce activarea sau blocarea receptorului și consecutiv o modificare conformațională a situsului efector, responsabilă de producerea răspunsului celular.

În funcție de modul de răspuns și de liganzii care îi activează, receptorii pot fi clasificați în două categorii principale:

- *receptori intracelulari*, care pot pătrunde la nivelul nucleului, unde modulează expresia unor gene ca răspuns la activarea ligand-dependentă
- *receptori transmembranari*, încorporați în stratul bilipidic al membranei celulare

- receptori care funcționează prin interacțiunea cu diverse sisteme efectoare, fie direct - *canalele ionice ligand-dependente* (conțin un por central care se deschide ca răspuns la atașarea ligandului), fie indirect - *receptorii cuplați cu proteinele G* (induc un răspuns celular prin intermediul unor sisteme enzimatice intracelulare)
- receptori care posedă activitate enzimatică intrinsecă (*receptorii tirozin-kinazici*).

18.1.1. RECEPTORII INTRACELULARI

Receptorii intracelulari (interni sau citoplasmatici) pot fi activați prin legarea unor molecule hidrofobe capabile să străbată membrana celulară. Astfel de molecule hidrofobe care pot străbate cu ușurință membranele celulare includ hormonii steroizi precum cortizolul (sintetizat în cortexul suprarenalian), hormonii sexuali sau vitamina D. La nivelul acelorași receptori se realizează însă și transducția semnalului produs de alte molecule semnal hidrofobe, precum hormonii tiroidieni sau retinoizii derivați din vitamina A (acidul retinoic).

În torentul sanguin, acești hormoni circulă legați de o gamă variată de proteine transportoare, dar și de globuline transportoare specifice. Cea mai mare proporție a acestor hormoni circulă în plasmă legată de proteinele transportoare, doar o mică fracțiune aflându-se în stare liberă, nelegată. Această ultimă fracțiune este considerată fracțiunea activă la nivelul celulelor țintă, între cele două fracțiuni, liberă și legată, existând un permanent echilibru la nivelul fluidului extracelular. Balanța dintre aceste două fracțiuni, liberă și legată, permite nu doar o distribuție omogenă a hormonilor la nivelul celulelor țintă, dar și modularea unor fluctuații importante ale concentrației plasmatice a acestor hormoni și prelungirea în timp a efectului lor biologic.

Odată ajunse în mediul intracelular, aceste molecule semnal se atașează receptorilor intracelulari care funcționează ca *factori de transcripție*, reglând sinteza ARN mesager (ARNm) și mediind expresia genică (procesul de transformare a informației conținute în ADN-ul celular într-o secvență de aminoacizi care va constitui în final o proteină). Legarea ligandului de receptorul citoplasmatic determină o modificare conformațională a receptorului care permite expunerea situsului de legare pentru ADN. Complexul hormon-receptor astfel format pătrunde ulterior în nucleul celulei, fixându-se la nivelul unor secvențe ADN specifice aflate în vecinătatea genei a cărei expresie urmează să fie reglată și declanșând procesul de transcripție genică.

Localizarea intracelulară a receptorilor interni nu este însă omogenă. Receptorul pentru glucocorticoizi rămâne în citoplasmă până la momentul atașării ligandului, întregul complex hormon-receptor pătrunzând ulterior în interiorul nucleului (Figura 18.1).

Spre deosebire de acești receptori, receptorii pentru estrogeni și cei pentru hormonii tiroidieni sunt localizați intranuclear chiar în absența ligandului (Figura 18.2). Similitudinea structurală a tuturor acestor receptori sugerează însă că toți fac parte dintr-o familie de proteine care au evoluat dintr-un precursor comun.

Întregul proces de reglare ligand-dependentă a transcripției genice are loc direct, bazându-se pe interacțiunea hormon-receptor și pe cea dintre complexul astfel format și sec-

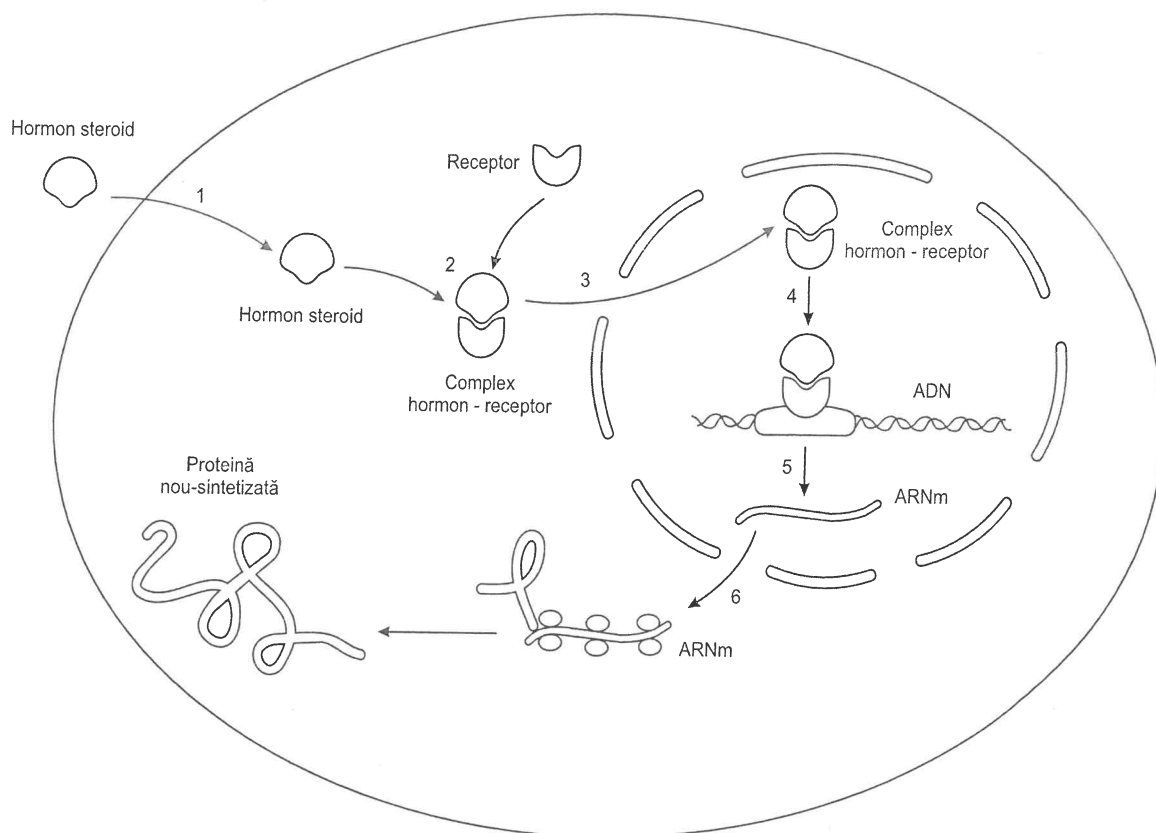


Figura 18.1. Mecanismul generării răspunsului celular (sinteza proteică) de către hormonii steroizi

vențele ADN intranucleare specifice, fără intervenția unor noi receptori intranucleari sau a altor molecule semnal. Acest proces se desfășoară lent, necesitând un interval de câteva ore pentru a fi complet, însă efectul este unul de lungă durată. Aceste particularități implică cel puțin două consecințe terapeutice majore:

- Acești hormoni, atunci când sunt administrați exogen, prezintă un interval de latență, necesitând un interval de timp variabil, cuprins în general între 30 de minute și câteva ore, până la exercitarea efectului complet, interval necesar pentru sinteza de noi proteine. Această particularitate explică incapacitatea acestor agenți de a modifica o stare fiziopatologică în decurs de câteva minute (ex., glucocorticoizii nu vor ameliora imediat simptomele unei crize acute de astm bronșic).
- Efectele acestor agenți pot persista timp de ore sau zile după ce concentrația agonistului a fost redusă la zero. Persistența efectului se datorează în primul rând turnover-ului relativ lent al majorității enzimelor și proteinelor sintetizate pe această cale, dar și afinității crescute a receptorului pentru hormonul administrat, responsabilă de disocierea lentă a complexului hormon-receptor. Din punct de vedere terapeutic, acest fenomen explică diminuarea lentă a efectelor terapeutice (sau toxice) ale acestor hormoni la întreruperea tratamentului, dar și absența unei corelații temporale liniare între concentrația plasmatică a hormonului și efectele sale biologice.

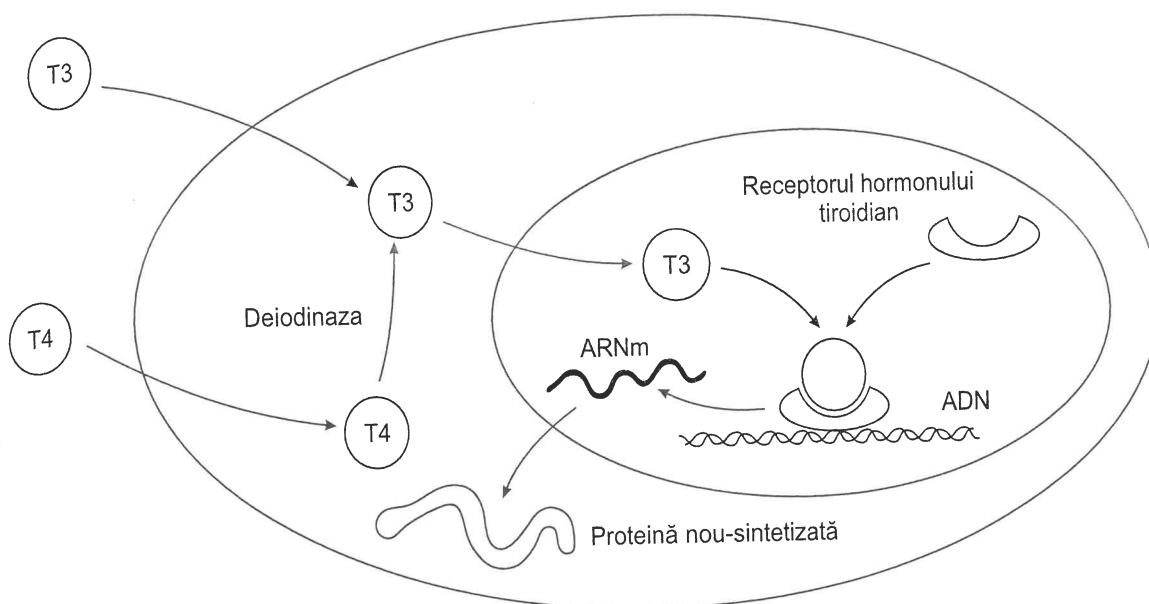


Figura 18.2. Mecanismul generării răspunsului celular (sinteza proteică) de către hormonii tiroidieni. T3 – hormonul tiroidian triiodotironina; T4 – hormonul tiroidian tiroxina.

Studierea receptorilor intracelulari prin tehnici de recombinare ADN a permis identificarea mecanismelor moleculare care stau la baza funcționării lor. Deleția situsului de legare a ligandului din structura receptorului pentru glucocorticoizi duce la formarea unei proteine trunchiate, cu afinitate mare pentru secvența ADN corespunzătoare și cu efect stimulator asupra transcripției genice, chiar în absența stimulării glucocorticoide. Această observație sugerează că legarea unui hormon steroid de receptorul corespunzător activează procesul de transcripție prin eliberarea unei componente inhibitorii și că acest mecanism inhibitor este exercitat, în absența ligandului, de situsul de legare a ligandului din structura receptorului.

18.1.2 RECEPTORII TRANSMEMBRANARI

O serie de compuși polipeptidici care reunesc o gamă largă de hormoni peptidici, factori de creștere și citokine, utilizează sisteme transmembranare de transducție a semnalului pentru a-și exercita efectele biologice. Spre deosebire de hormonii steroizi, aceste substanțe nu pot traversa membranele celulare, ci își vor iniția efectele asupra celulelor țintă prin acțiunea la nivelul receptorilor aflați la suprafața membranelor celulare. Întrucât acești compuși nu pătrund în celula țintă, ci acționează doar la suprafața ei, au fost denumiți *mesageri primari*, efectele lor fiind mediate frecvent prin intermediul unor molecule semnal intracelulare cu greutate moleculară mică, precum AMP_c sau Ca^{2+} , molecule denumite din acest motiv *mesageri secunzi* (Figura 18.3).

Receptorii implicați în medierea semnalului acestor compuși sunt *receptori transmembranari*, proteine care străbat membrana celulară și care realizează transducția semnalului, transformând semnalul extracelular într-un semnal intracelular. Astfel, liganzii care interacționează cu acești receptori vor genera răspunsuri intracelulare fără a pătrunde însă în spațiul intracelular.

Structura fiecărui receptor transmembranar implică existența a trei componente:

- un *domeniu extracelular* de fixare a ligandului (situsul de legare), format din capetele amino-terminale ale proteinelor din structura receptorului; acest domeniu poate fi puternic modulată prin procese de glicozilare, adăugarea unei grupări sulfat sau fosfat, sau prin formarea de legături disulfid;
- unul sau mai mult *domenii transmembranare* hidrofobe care străbat stratul bilipidic al membranei și asigură transducția transmembranară a semnalului extracelular; și
- un *domeniu intracelular* sau citoplasmatic (situsul efector), format din capetele carboxi-terminale ale proteinelor din structura receptorului, care răspunde la legarea ligandului de receptor prin interacțiunea cu diverse alte molecule precum proteinele G, sau se comportă el însuși ca o enzimă (receptorii tirozin-kinazici).

Mărimea și proporția pe care o ocupă fiecare dintre aceste domenii în structura unui receptor este extrem de variabilă, specifică tipului de receptor.

Din punct de vedere funcțional, receptorii transmembranari pot fi clasificați în trei categorii:

- canale ionice ligand-dependente,
- receptori cuplați cu proteinele G și
- receptori cu activitate enzimatică intrinsecă.

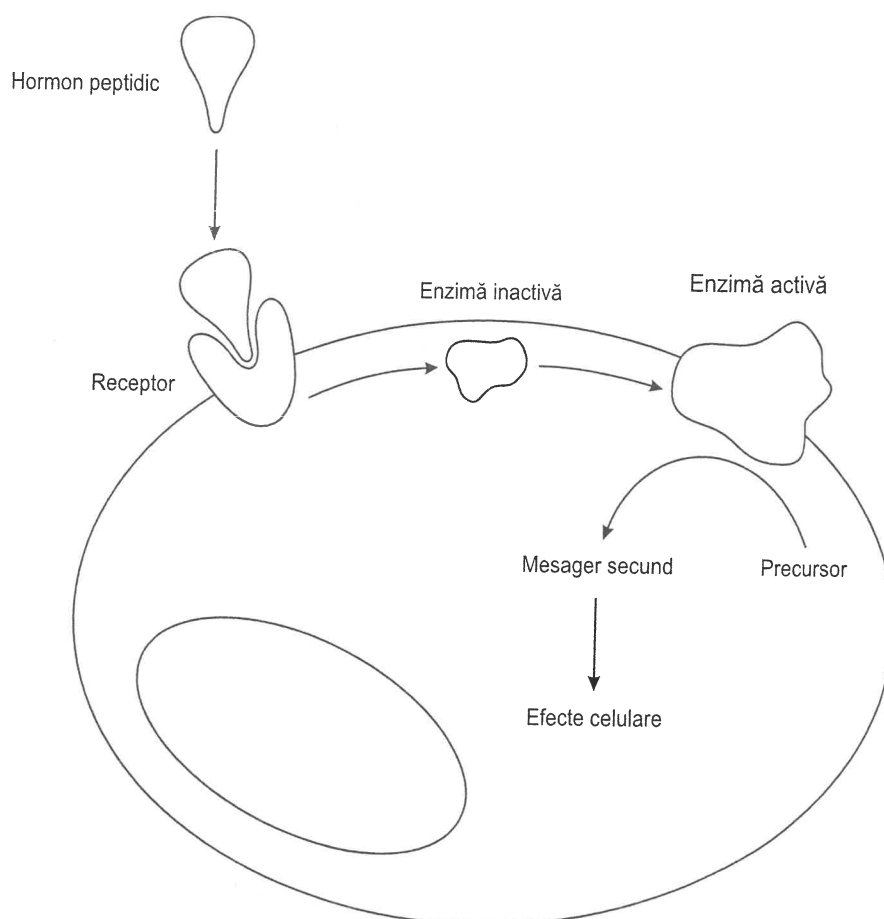


Figura 18.3 Mecanismul generării răspunsului celular de către hormonii peptidici

Legarea ligandului la domeniul extracelular al *canalelor ionice ligand-dependente* determină o modificare conformațională a canalelor, determinând deschiderea acestora și permițând diverșilor ioni, precum Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} sau K^+ , să treacă de o parte și de cealaltă a membranei celulare. Pentru a permite mișcarea acestor ioni, acești receptori prezintă un domeniu transmembranar de dimensiuni mari.

Legarea ligandului de *receptorii cuplați cu proteinele G* determină activarea unei proteine membranare cunoscute sub numele de proteină G, care va interacționa în continuare cu un canal ionic membranar sau cu o enzimă membranară. Deși toți receptorii cuplați cu proteine G au șapte domenii transmembranare, domeniul extracelular și situsul de legare al proteinei G sunt specifice fiecărui receptor.

Receptorii cu activitate enzimatică intrinsecă au domeniul intracelular cuplat cu o enzimă sau domeniul intracelular al receptorului însuși se comportă ca o enzimă. Legarea ligandului de domeniul extracelular al acestor receptori determină activarea directă a enzimei intracelulare, care generează ulterior un șir de evenimente intracelulare responsabile de răspunsul celular specific.

18.1.2.1 Canalele ionice ligand-dependente (receptorii ionotropici)

Structura bilipidică a membranelor celulare reprezintă o barieră hidrofobă dielectrică în calea moleculelor hidrofile și a particulelor încărcate electric, funcționând astfel ca un izolator electric. Difuziunea transmembranară a ionilor impune așadar existența la nivelul membranei hidrofobe a unor căi hidrofile, bune conductoare pentru particulele încărcate electric. Acest rol este jucat de *canalele ionice*. Prin faptul că reglează fluxul transmembranar al ionilor precum Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- sau Mg^{2+} pe baza gradientului electrochimic, canalele ionice sunt elemente cheie în producerea unor efecte celulare specifice, contribuind în același timp la stabilirea și controlul gradientelor electrice și chimice de o parte și de cealaltă a membranelor celulare (Figura 18.4).

Canalele ionice diferă între ele în funcție de mecanismul responsabil de deschiderea / închiderea lor, de intervalul de timp necesar deschiderii / închiderii, de tipul de ioni al căror pasaj îl permit, de selectivitate, de modul în care pot fi reglate, de numărul de subunități din care sunt alcătuite, dar și de o serie de alte aspecte structurale. Deși deschiderea și închiderea canalelor ionice se poate produce ca răspuns la stimuli extrem de variați, majoritatea canalelor ionice pot fi încadrate în una din următoarele trei categorii:

- canale ionice voltaj-dependente, a căror deschidere / închidere se produce ca răspuns la modificările potențialului electric de membrană,
- canale ionice ligand-dependente, a căror deschidere / închidere se produce ca răspuns la acțiunea unor liganzi specifici,
- canale ionice mecanosensibile, a căror deschidere / închidere se produce ca răspuns la deformarea mecanică a membranei celulare.

Transferul transmembranar al ionilor este facilitat de prezența în structura acestor canale a unui domeniu transmembranar de dimensiuni mari. Pentru a putea interacționa cu cozile

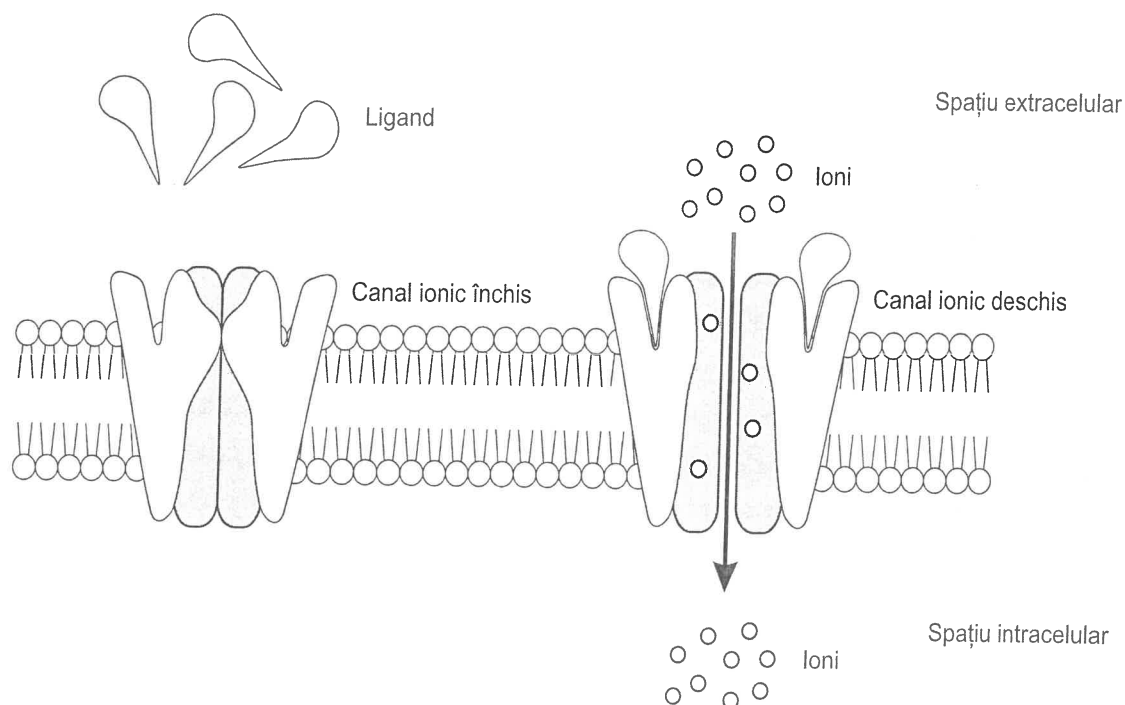


Figura 18.4 Reprezentare schematică a mecanismului de funcționare a canalelor ionice ligand-dependente

acizilor grași dispuse în regiunea centrală a membranei celulare fosfolipidice, o proporție importantă a aminoacizilor care formează domeniul transmembranar sunt de natură hidrofobă, în timp ce aminoacizii care contribuie la formarea porului central al acestor canale sunt hidrofilii, pentru a putea permite pasajul apei și ionilor.

Legarea ligandului la domeniul extracelular al *canalelor ionice ligand-dependente* determină o modificare conformațională a canalelor, determinând deschiderea acestora și permițând diversilor ioni să treacă de o parte și de cealaltă a membranei celulare pe baza gradientului electrochimic. În mod caracteristic, situsul de legare al ligandului este situat la distanță de porul central care permite transferul transmembranar al ionilor (situs de legare alosteric). Pe durata persistenței complexului ligand-receptor, porul central al canalului se poate închide și deschide de mai multe ori succesiv, acest proces încetând doar odată cu disocierea completă a ligandului de receptor.

Grupul canalelor ionice ligand-dependente cuprinde receptorul nicotinic al acetilcolinei, receptorii acidului γ -aminobutiric (GABA_A și GABA_C), receptorul glicinei, receptorii glutamatului și receptorii ATP-dependenți (ATP_2x). Acțiunea multora dintre agenții terapeutici cu largă utilitate clinică este de asemenea rezultatul interacțiunii cu astfel de receptori, agentul farmacologic mimând sau blocând efectele unor liganzi endogeni care reglează fluxul ionic prin canalele membranare ligand-dependente.

Canalele ionice ligand-dependente permit transferul extrem de rapid al ionilor de o parte și de cealaltă a membranelor celulare (107-109 ioni / secundă), de câteva ori mai rapid decât majoritatea sistemelor de transport activ. Intervalul de timp scurs din momentul legării ligandului de domeniul extracelular al canalului și până la producerea efectului celular este astfel extrem de redus, de ordinul milisecundelor. Rapiditatea acestui mecanism de transducție a

semnalului explică rolul central al acestor canale în neurotransmiterea sinaptică între celulele nervoase excitabile, dar și în efectele modulatorie ale unor hormoni sau neurotransmițători.

Canalul cuplat cu receptorul colinergic nicotinic este probabil cel mai bine caracterizat canal ionic ligand-dependent. Acest receptor are o structură pentamerică, fiind alcătuit din cinci subunități glicozilate (două lanțuri α , unul β , unul γ și unul δ , toate cu greutatea moleculară cuprinse între 43 kDa și 50 kDa), codificate de cinci gene diferite, fiecare dintre aceste subunități conținând patru domenii transmembranare așezate circular în jurul unui orificiu central cu diametrul de 80 Å, care asigură calea de acces a ionilor la nivelul membranei celulare postsinaptice. Legarea acetilcolinei de situsurile subunității α determină o modificare conformațională care va conduce la deschiderea tranzitorie a canalului central apos, prin care ionii de Na^+ penetrează pe baza gradientului electrochimic din fluidul extracelular în interiorul celulei, generând un potențial postsinaptic localizat (o depolarizare). Interacțiunea dintre cele două situsuri de legare ale acetilcolinei de la suprafața receptorului și canalul ionic se face printr-un mecanism alosteric, legarea ligandului declanșând modificări structurale la distanță de situsurile de legare.

Fosforilarea protein-kinazelor și interacțiunea cu proteinele G intracelulare permit modularea activității acestor canale. Kinazele AMP_c -dependente, dar și diferite alte tipuri de kinaze, fosforilează receptorul nicotinic al acetilcolinei, afectând rata de desensibilizare a acestuia și modulându-i activitatea. Legăturile necovalente formate între canalele ionice membranare ligand-dependente și proteinele G au fost de asemenea implicate în modularea activității acestor canale.

18.1.2.2 Receptorii cuplați cu proteinele G (receptorii metabotropici)

18.1.2.2.1 Structura receptorilor cuplați cu proteinele G

Receptorii cuplați cu proteinele G sunt reprezentați de o familie de receptori transmembranari care, odată activați prin legarea ligandului de receptor, activează în interiorul celulei căi de transducție a semnalului dependente de proteinele G. Acești receptori sunt implicați într-un număr mare de procese fiziologice și fiziopatologice precum simțul vizual sau olfactiv, reglarea comportamentului și a dispoziției, reglarea activității sistemului imun și a proceselor inflamatorii sau transmiterea impulsurilor electrice în cadrul sistemului nervos autonom.

Prima descriere a structurii unui receptor uman cuplat cu proteine G (de fapt un receptor β_2 -adrenergic) a fost realizată abia în anul 2007. Ulterior, analiza genomului uman a identificat circa 800 de gene care codifică peste o mie de subtipuri de receptori cuplați cu proteinele G. Aproximativ 350 dintre aceștia sunt capabili să detecteze hormoni, factori de creștere sau alți liganzi endogeni, circa 150 dintre ei îndeplinind funcții încă necunoscute. Superfamilia genelor care codifică receptorii cuplați cu proteinele G poate fi împărțită în trei clase principale - A, B și C. Aproape 85% dintre aceste gene sunt incluse în categoria A, peste 50% dintre ele codificând receptori implicați în simțul olfactiv. Anomaliile mecanismelor de transducție a semnalului mediate de acești receptori au fost incriminate în apariția unui număr mare de afecțiuni precum diabetul zaharat, cecitatea, alergiile, depresia, o serie de

afecțiuni cardiovasculare sau diverse forme de cancer, acești receptori fiind de altfel ținta a circa 30% dintre agenții farmacologici moderni.

Din punct de vedere structural, receptorii cuplați cu proteinele G sunt caracterizați prin prezența unei regiuni amino-terminale dispuse în spațiul extracelular, a șapte α -helixuri transmembranare compuse din 20-28 de aminoacizi hidrofobi fiecare (notate TM1 până la TM7) conectate între ele prin trei bucle extracelulare și trei intracelulare, și a unei regiuni carboxi-terminale intracelulare (Figura 18.5). Aceste componente se dispun într-o structură terțiară de formă cilindrică, cele șapte α -helixuri transmembranare formând o mică cavitate ("buzunăraș") la nivelul membranei celulare. Regiunile extracelulare conțin în structura lor și două reziduuri de cisteină, bine conservate, între care se formează legături disulfide, cu rolul de a stabiliza structura receptorului. Deși această structură este comună tuturor tipurilor de receptori cuplați cu proteinele G, domeniul extracelular și situsul de legare a proteinei G sunt specifice fiecărui receptor.

Pe baza structurii lor, receptorii cuplați cu proteinele G au fost clasificați în trei categorii distincte:

- Grupul I de receptori cuplați cu proteinele G cuprinde receptori formați din 300-400 de aminoacizi, cu regiuni amino-terminale scurte și care leagă liganzi de dimensiuni mici (sub 2 kDa) precum hormonii hipotalamici stimulatori;
- Grupul II de receptori cuplați cu proteinele G cuprinde receptori formați din 700-800 de aminoacizi, cu domenii extracelulare de dimensiuni mari și care leagă liganzi de dimensiuni mari (30-40 kDa) precum hormonii glicoproteici;

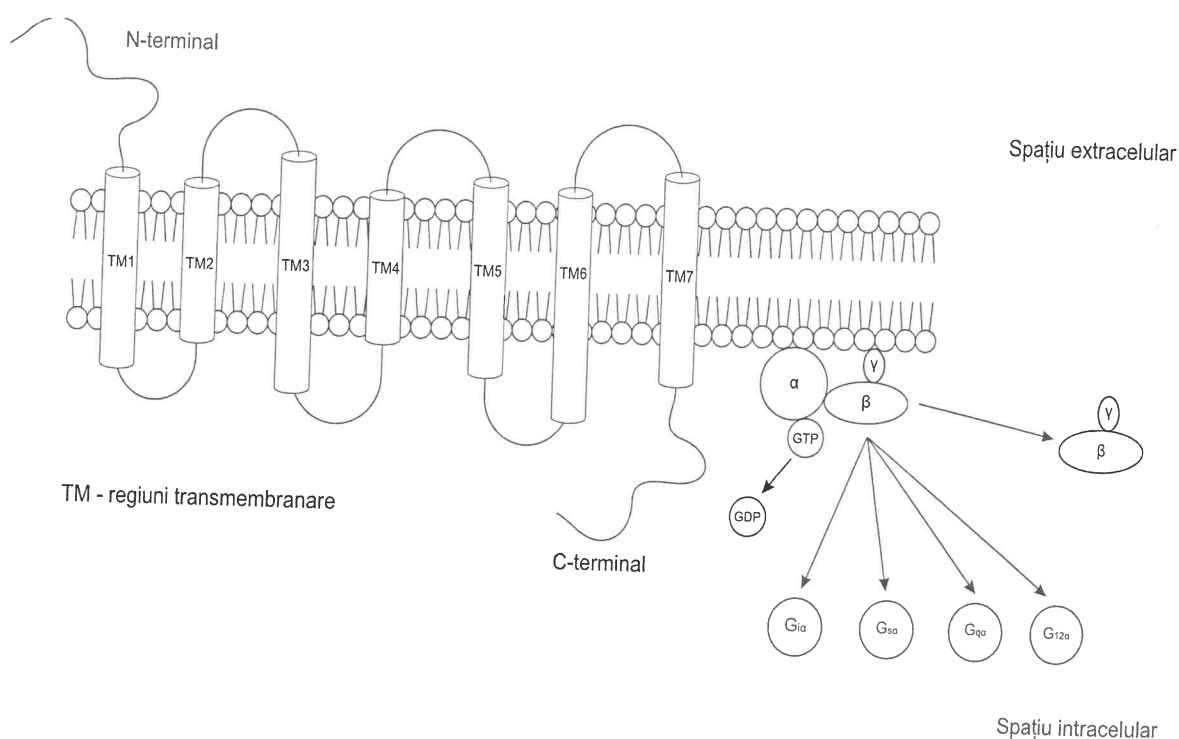


Figura 18.5 Structura receptorilor cuplați cu proteinele G și mecanismul generării răspunsului celular prin intermediul acestor receptori

- Grupul III de receptori cuplați cu proteinele G cuprinde receptori formați din 400-600 de aminoacizi, cu domenii extracelulare de dimensiuni mari și care leagă liganzi de dimensiuni intermediare (4-10 kDa) precum calcitonina sau peptidul vasoactiv intestinal.

18.1.2.2 Proteinele G

Descoperirea *proteinelor G* li se datorează cercetătorilor americani Alfred Gilman și Martin Rodbell. În cursul investigațiilor lor privind efectele stimulative ale epinefrinei, cei doi au observat că atunci când un hormon precum epinefrina se leagă de receptorul specific, receptorul nu stimulează direct enzime intracelulare precum adenilatciclaza, ci stimulează mai întâi o proteină G, responsabilă la rândul ei de stimularea producerii de către adenilatciclază a mesagerului secund AMP_c . Pentru această descoperire, cei doi cercetători americani au primit în anul 1994 premiul Nobel pentru Medicină.

Ulterior, studiile asupra proteinelor G au demonstrat rolul lor central în transducția semnalului unui număr mare de hormoni, neurotransmițători, chemokine, factori autocrini sau paracrini. Aceste proteine membranare stau la baza unei vaste rețele având ca efecte reglarea activității unui număr important de enzime implicate în metabolismul celular, unor canale ionice, transportori transmembranari, dar și a altor componente ale aparatului celular, acestea controlând la rândul lor o gamă largă de procese celulare precum transducția și transcripția semnalului, sinteza proteică, exocitoza, contractilitatea, secreția, dar și mobilitatea, creșterea, proliferarea și diferențierea celulară. Modularea transducției transmembranare a semnalelor prin intermediul proteinelor G se bazează pe capacitatea acestora de a funcționa ca molecule "comutator", controlând interacțiunea dintre receptorii de suprafață și unul sau mai mulți mediatori secunzi intracelulari.

Pe baza dimensiunilor lor, proteinele G au fost clasificate în două categorii: proteinele G mari (heterotrimerice), responsabile pentru majoritatea efectelor intracelulare, și proteinele G mici, aparținând superfamiliei de GTP-aze *Ras*. Proteinele G heterotrimerice sunt responsabile de transducția transmembranară a semnalului de la receptorii de suprafață la o serie de efectori intracelulari, precum adenilatciclaza, fosfolipaza C, guanozin monofosfatul ciclic (GMPc), fosfodiesteraza, dar și o serie de sisteme efectoare care implică canale ionice.

Proteinele G heterotrimerice sunt alcătuite din trei subunități proteice, α , având greutate moleculară cuprinsă între 39 kDa și 46 kDa, β , cu greutate moleculară de circa 37 kDa, și γ , cu greutate moleculară de 8 kDa. Subunitățile $\beta\gamma$ ale proteinei G sunt în principal implicate în ancorarea întregului complex proteic la membrana celulară. Deși studii recente au demonstrat că subunitățile $\beta\gamma$ pot regla prin mecanism direct activitatea unor efectori precum fosfolipaza A_2 , izoformele β ale fosfolipazei C, adenilatciclaza sau unele canale ionice (canalele de Ca^{2+} de tip L), subunitatea α , la nivelul căreia se găsește situsul de legare al GTP și care posedă activitate GTP-azică intrinsecă, este cea care conferă specificitate proteinei. În plus, subunitățile α ale proteinelor G sunt responsabile și de o serie de alte funcții importante, mediind legarea întregului complex al proteinei G de receptor, legarea moleculei de guanozin

difosfat (GDP), hidroliza GTP, legarea de subunitatea β , interacțiunea cu sistemul efector și reglarea interacțiunii cu acesta.

Pe baza omologiei genice și a funcției subunității α , proteinele G au fost clasificate în patru categorii:

- Proteinele G_s – Prin stimularea directă a enzimei adenilatciclază asociate membranei celulare, activarea acestor proteine promovează conversia ATP-ului intracelular în AMPc. Acesta din urmă va acționa ca mesager secund, declanșând activarea protein-kinazei A, care la rândul său va fosforila o serie întreagă de ținte intracelulare.
- Proteinele G_i – Efectul activării acestor proteine este opus celui obținut prin stimularea proteinelor G_s , proteinele G_i inhibând producerea de AMPc din ATP prin inhibarea adenilatciclazei. Proteinele G_i sunt implicate însă și în stimularea sistemului de mesageri secunzi fosfoinozotide, precum și în reglarea activității unor canale de K^+ și Ca^{2+} .
- Proteinele G_q – Activarea proteinelor G_q este responsabilă de stimularea fosfolipazei C atașate membranei, care clivează la rândul său fosfoinozitolul (PIP) membranar în doi mesageri secunzi, inozitoltrifosfat (IP_3) și diacilglicerol (DAG).
- Proteinele G_{12} – Acest subtip de proteine G este implicat în controlul remodelării citoscheletului celular și a proceselor de migrare celulară.

18.1.2.2.3 Mecanismul de transducție a semnalului mediat de proteinele G

Mecanismul de transducție a semnalului realizat prin intermediul receptorilor cuplați cu proteinele G este departe de a fi complet înțeles. În majoritatea cazurilor, activarea acestei căi de transducție a semnalului se desfășoară în trei etape: (1) legarea ligandului de domeniul extracelular al receptorului, care (2) declanșează activarea unei proteine G localizate pe suprafața citoplasmatică a membranei celulare și care, la rândul ei, (3) modifică activitatea unui efector, de obicei o enzimă sau un canal ionic. La rândul său, acest efector induce modificarea concentrației intracelulare a unui mesager secund, responsabil de producerea răspunsului celular.

Mecanismul modificării concentrației intracelulare a AMPc, unul dintre cei mai larg răspândiți mesageri secunzi intracelulari, este ilustrativ în acest sens. Modificarea concentrației intracelulare a AMPc are loc ca răspuns la acțiunea adenilatciclazei, enzimă efectoră membranară care convertește ATP-ul intracelular în AMPc. La rândul său, AMPc va determina activarea protein-kinazei A, care va fosforila o serie de alte proteine intracelulare, declanșând o cascadă de evenimente intracelulare. Activarea adenilatciclazei are loc ca răspuns la activarea proteinei G_s corespunzătoare prin legarea de receptorul transmembranar specific a unui hormon sau neurotransmițător.

În absența ligandului, receptorii cuplați cu proteinele G se află într-o stare bazală inactivă, caracterizată de prezența proteinei G inactive la nivelul suprafeței citoplasmatică a membranei celulare, fără a exista însă o interacțiune directă între aceasta și receptorul membranar adiacent.

Activarea receptorilor cuplați cu proteinele G se poate produce ca răspuns la o gamă variată de agoniști precum amine, hormoni, neurotransmițători sau proteine. Unii dintre acești agoniști se leagă la buclele extracelulare ale receptorului, în timp ce alții pot penetra până la regiunea transmembranară a acestuia. Molecule ligand precum epinefrina se leagă în mod tipic de receptorul cuplat cu proteinele G la nivelul "buzunărașului" format de cele șapte helixuri transmembranare, în timp ce moleculele mari (proteine sau peptide mari) se leagă cel mai frecvent la nivelul buclelor extracelulare, iar receptorii glutamatului de capătul amino-terminal al receptorului.

În cazul proteinelor G_s , legarea ligandului de receptor determină modificarea conformațională a receptorului, expunând situsul de legare al proteinei G și permițând legarea proteinei G la receptor. Legarea proteinei G_s de receptor este urmată de activarea mecanică a proteinei G_s nou atașate, aceasta eliberând molecula de GDP pe care o poartă și legând în locul acesteia o moleculă de GTP. Acest transfer între moleculele de GDP și GTP la suprafața subunității α a proteinei G_s determină scăderea afinității subunității α atât pentru receptor cât și pentru subunitățile $\beta\gamma$, având drept consecință disocierea complexului receptor-proteină G, dar și a subunităților α și $\beta\gamma$ ale proteinei. Se creează astfel premisele ca subunitatea α activată, dar și subunitățile $\beta\gamma$ aflate în stare liberă, sau ambele, să interacționeze cu unul sau mai mulți efectori, generând mediatori secunzi intracelulari. Întregul proces va fi stopat de hidroliza moleculei de GTP de la suprafața subunității α și formarea de GDP, datorită activității GTP-azice a acestei subunități. Cele două componente, α și $\beta\gamma$, se vor reuni în structura heterotrimerică a proteinei G inactive ($G\alpha\beta\gamma$), întregul ciclu reîncepând.

Cu toate că interacțiunea ligand-receptor este frecvent extrem de scurtă, de ordinul milisecundelor, durata activării sistemului efector este în general mult mai durabilă, depinzând în mai mare măsură de longevitatea legăturii dintre molecula de GTP și proteina G_s , condiționată de mecanismul lent de hidroliză a GTP, decât de afinitatea receptorului pentru ligand. Acest mecanism explică persistența stării activate a proteinei G_s pentru un interval lung de timp după disocierea ligandului de receptor (câteva zeci de secunde), fapt care duce la amplificarea marcată a semnalului inițial.

În stare activată, receptorul cuplat cu proteinele G devine însă un excelent substrat pentru fosforilarea reziduurilor de serină și treonină din vecinătatea capătului carboxi-terminal. Fosforilarea acestor reziduuri crește afinitatea domeniului intracelular al receptorului pentru proteine din grupul β -arestinelor, care blochează steric cuplarea proteinelor G de receptor și previn activarea acestora, sau induc internalizarea receptorilor, ambele mecanisme fiind implicate în dezactivarea (desensibilizarea) receptorului. Spre deosebire de downregulare, desensibilizarea receptorilor este însă reversibilă relativ rapid prin defosforilarea receptorului și disocierea sa de proteinele desensibilizante. În această nouă conformație, receptorul poate activa o nouă proteină G sau poate trece din nou în forma inactivă. Unul dintre mecanismele principale implicate în desensibilizarea acestor receptori este expunerea prelungită a receptorului la ligand.

18.1.2.3 Receptorii cu activitate enzimatică intrinsecă (receptorii tirozin-kinazici)

Receptorii cu activitate enzimatică intrinsecă sunt implicați în medierea primelor etape ale transducției semnalului inițiat de insulină, factori de creștere precum factorul de creștere epidermal, factorul de creștere derivat plachetar, factorul de creștere fibroblastic, factorul vascular de creștere endotelială, citokine, dar și de diferiți hormoni trofici. Cincizeci și opt din cele 90 de gene ale genomului uman care codifică tirozin-kinaze sunt implicate în codificarea receptorilor tirozin-kinazici. Acești receptori sunt implicați într-un număr mare de procese celulare fiziologice, dar și în dezvoltarea și progresia multor forme de neoplazii.

Din punct de vedere structural, există diferențe semnificative între diferitele subtipuri ale acestor receptori. Majoritatea receptorilor cu activitate enzimatică intrinsecă au o structură simplă, monomerică, traversând membrana o singură dată, deși în unele cazuri, pentru transducția eficientă a semnalului, pot fi necesari receptori cu structură dimerică. Astfel de receptori includ receptorul pentru insulină, care în absența ligandului formează dimeri legați prin legături disulfidice. Alteori, legarea ligandului la domeniul extracelular al receptorului este cel care induce formarea de structuri dimerice.

Fiecare monomer al receptorului are în structura sa un singur domeniu transmembranar hidrofobic alcătuit din 25-38 de aminoacizi, un domeniu extracelular amino-terminal și unul intracelular carboxi-terminal. Capătul amino-terminal prezintă o întreagă varietate de elemente înalt conservate, inclusiv situsurile de legare pentru imunoglobuline, factorul de creștere epidermal, dar și fibronectină III și regiuni bogate în cisteină, acestea fiind caracteristice fiecărui subtip de receptor. Indiferent însă de subtipul de receptor, domeniul citoplasmatic al acestor receptori prezintă cel mai înalt grad de conservare, cuprinzând domeniul catalitic responsabil de activitatea kinazică a receptorului, care catalizează autofosforilarea receptorului.

Procesul de transducție a semnalului mediat de receptorii cu activitate enzimatică intrinsecă începe odată cu legarea ligandului de receptor și activarea alosterică a protein-kinazei citoplasmatică. Activarea receptorului prin legarea ligandului induce în același timp autofosforilarea reziduurilor de tirozină de la nivelul domeniului citoplasmatic al receptorului, proces care poate intensifica sau prelungi durata activării alosterice inițiale induse de ligand (Figura 18.6). Acest mecanism explică spre exemplu persistența activității tirozin-kinazice a receptorului de insulină autofosforilat și după ce insulina a fost îndepărtată de la nivelul situsului de legare.

Calea de transducție a semnalului declanșată de acești receptori este însă una extrem complexă. Atât efectele de creștere a captării glucozei și aminoacizilor cât și cele de reglare a metabolismul glicogenului și trigliceridelor de către insulină par a fi mediate de o singură clasă de receptori tirozin-kinazici, în timp ce factorii de creștere inițiază la nivelul celulelor țintă un complex de evenimente mergând de la modificarea capacității de transport a membranei pentru protoni, ioni și diverși metaboliți până la modificări caracteristice în expresia unor gene. În timp ce unele dintre aceste răspunsuri implică fosforilarea indusă de serin-kinaze

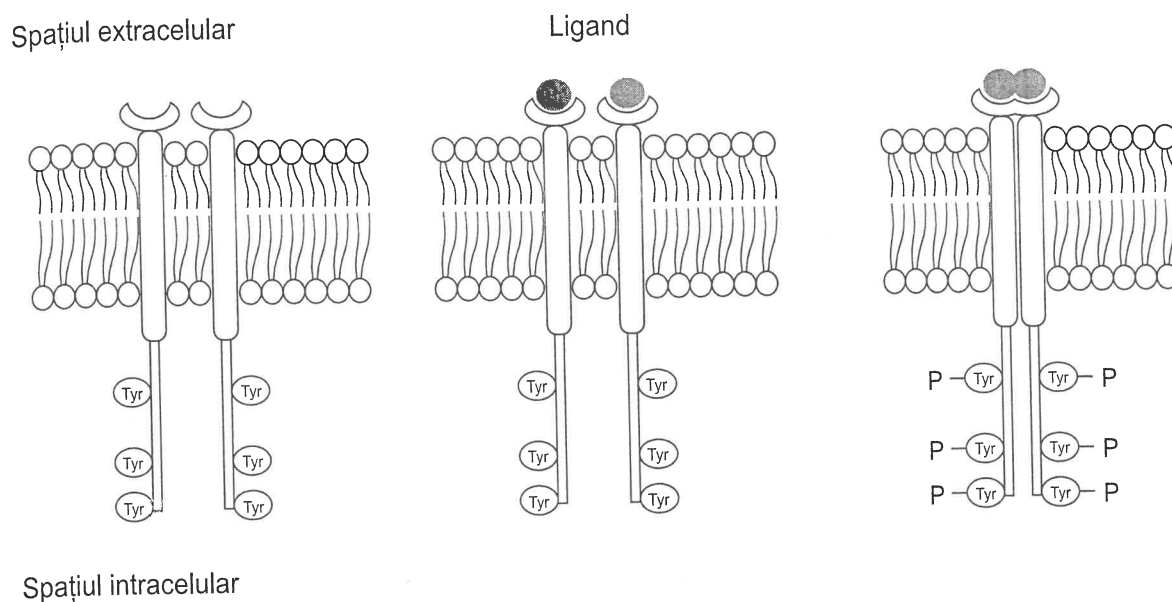


Figura 18.6 Mecanismul activării receptorilor tirozin-kinazici.

sau treonin-kinaze, altele se bazează pe intervenția unor factori de transcripție, care pot fi ei înșiși substratul activității kinazice.

Intensitatea și durata efectelor induse de activarea receptorilor tirozin-kinazici sunt puternic influențate de fenomenul de downregulare. Dincolo de efectele celulare directe pe care le induce, legarea ligandului de receptor accelerează procesul de endocitoză a receptorilor membranari, urmată de degradarea acestor receptori, dar și a ligandului, producându-se astfel o downregulare a receptorilor ligand-indusă. La fel ca și efectele intracelulare, acest proces este și el dependent de activitatea tirozin-kinazică a receptorului. Atunci când rata acestui proces depășește rata sintezei *de novo* a receptorilor, numărul total al receptorilor scade, capacitatea de răspuns a celulei la ligandul specific fiind considerabil redusă.

Alterarea mecanismelor de transducție a semnalelor mediate de receptorii tirozin-kinazici a fost implicată într-un număr important de afecțiuni neoplazice și degenerative. Reducerea mecanismului de transducție a semnalului mediat de receptorii pentru factorul de creștere epidermal spre exemplu a fost asociată cu apariția de boli neurodegenerative precum scleroza multiplă sau boala Alzheimer, în timp ce activitatea exagerată a acestor receptori a fost implicată în dezvoltarea unei game variate de tumori solide.

18.1.3 RECEPTORII NUCLEARI AI LIGANZILOR SPECIFICI RECEPTORILOR TRANS-MEMBRANARI

În accepțiunea clasică, receptorii liganzilor precum hormonii steroizi, sexuali, tiroidieni, ai vitaminei D sau retinoizilor sunt dipuși la nivelul nucleului celular, în timp ce receptorii hormonilor peptidici, ai factorilor de creștere, citokinelor sau eicosanoizilor sunt receptori dipuși exclusiv membranar. Contrar acestei convingeri, numeroase studii au reușit să demonstreze prezența de receptori specifici hormonilor peptidici, factorilor de creștere, citokinelor sau

eicosanoizilor în interiorul nucleului celular, dar și al altor organite celulare, prezența acestora fiind asociată cu procese de sinteză și degradare proteică intracelulare.

În timp ce receptorii de la nivelul organitelor celulare ar putea fi implicați în mecanisme catalitice și de biosinteză celulară, receptorii intranucleari nu pot fi implicați în astfel de procese. Deși acești receptori intranucleari, identificați la nivelul membranei nucleare, cromatinei, matricei nucleului și nucleolilor, au o structură asemănătoare cu cea a receptorilor membranari, între aceștia există și o serie de diferențe semnificative.

Odată activați, acești receptori pot media procese de transcripție genică, dar și de procesare și externalizare a moleculelor de ARN în citoplasma celulară.

Mecanismele implicate în transducția semnalului mediate de acești receptori "hibridi" sunt departe de a fi complet înțelese. Rămâne neclar cum reușesc receptorii membranari să ajungă la nivelul nucleului, cum reușesc liganzii să pătrundă intranuclear, ce efecte celulare produce activarea acestor receptori și cât de importante sunt aceste mecanisme.

O posibilă explicație a prezenței acestor receptori la nivelul nucleului poate fi legată de deplasarea, prin mecanisme încă neelucidate, a receptorilor membranari internalizați prin endocitoză și care au reușit să scape procesului de degradare. Pe de altă parte, este posibil ca unii dintre acești receptori să nu fi fost niciodată prezenți la nivelul membranei celulare, ci să fi ajuns direct la nivelul nucleului, imediat ce au fost sintetizați la nivelul reticulului endoplasmic rugos și modificați posttranslațional la nivelul aparatului Golgi.

La rândul său, ligandul ar putea proveni din disocierea intracelulară a complexului ligand-deceptor internalizat anterior. Pe de altă parte, multe dintre celulele organismului sunt capabile ele însele să sintetizeze o serie de agoniști care ar putea de fapt să nu păărăsească niciodată spațiul intracelular, ci să acționeze direct asupra acestor receptori. Acest mecanism de tip *intracrin* a fost incriminat în reglarea biosintezei de hormon coriogonadotrop în coriocarcionome.

18.1.4 REGLAREA RECEPTORILOR CELULARI

18.1.4.1 Biosinteza și degradarea receptorilor celulari

La fel ca în cazul celorlalte proteine, sinteza receptorilor celulari are loc la nivelul reticulului endoplasmic rugos. Odată sintetizați, receptorii sunt modificați posttranslațional la nivelul aparatului Golgi și inserați la nivelul membranei celulare, nucleului celular sau al altor organite celulare. Degradarea receptorilor are loc la nivelul spațiului intracelular, sub acțiunea lizozimilor. Procesul de fosforilare a receptorilor sub acțiunea ligandului poate influența durata de viață a unui receptor celular, înclinând balanța înspre biosinteză sau degradare. Astfel, ritmul biosintezei și degradării receptorilor celulari este puternic modulată de o serie de factori intra- și extracelulari, cel mai important dintre aceștia fiind ligandul însuși.

În cazul receptorilor transmembranari, formarea complexului ligand-receptor este urmată de internalizarea acestui complex în spațiul intracelular printr-un proces de endocitoză, unde complexul poate urma două căi distincte. În unele cazuri, imediat după internalizarea com-

plexului, receptorul disociază de ligand și suferă un proces de reciclare (retro-endocitoză), revenind la nivelul membranei celulare, unde va putea fi reactivat prin legarea ligandului specific; acest proces se poate repeta de până la 50 de ori înainte ca receptorul să fie degradat. În alte cazuri, internalizarea complexului receptor-ligand este urmată la foarte scurt timp de degradarea întregului complex de către lizozomi.

18.1.4.2 Fenomenele de upregulare, downregulare și desensibilizare a receptorilor celulari

Modificarea capacității de legare a unui ligand la receptor poate fi consecința modificării afinității receptorului pentru ligand (desensibilizare), dar mai frecvent a modificării numărului de receptori disponibili pentru legarea cu ligandul (downregulare / upregulare).

Expunerea prelungită sau repetată a receptorului la interacțiunea cu liganzii specifici favorizează creșterea afinității domeniului intracelular al receptorilor cuplați cu proteinele G pentru proteine din grupul β -arestinelor, care blochează steric cuplarea proteinelor G de receptor și previn activarea acestora, inducând astfel desensibilizarea receptorului. În cazul agenților terapeutici, acest mecanism depinde de concentrația substanței administrate și de durata administrării, fiind însă reversibil relativ rapid la întreruperea tratamentului, prin defosforilarea receptorului și disocierea sa de proteinele desensibilizante. Desensibilizarea receptorilor poate fi de asemenea rezultatul disocierii receptorilor de sistemele efectoare sau a scăderii activității mecanismelor aflate în aval de aceste sisteme efectoare.

Spre deosebire de desensibilizare, reducerea numărului de receptori disponibili pentru legarea cu ligandul (downregularea) poate fi rezultatul internalizării receptorilor, degradării exagerate sau scăderii biosintezei receptorilor. Alteori, mesagerii secundari rezultați prin mecanismul de transducție a semnalului mediat de acești receptori determină reducerea numărului de receptori prin mecanism de feedback negativ asupra nivelurilor de ARNm ale receptorului, promovând în același timp degradarea receptorilor deja existenți. Activarea unor protein-kinaze poate fi de asemenea implicată în fenomene de upregulare sau downregulare ligand-dependente, așa cum se întâmplă în cazul prolactinei, responsabilă de upregularea receptorilor prolactinici.

Cu toate că fenomenul de upregulare a receptorilor joacă roluri importante în diverse procese fiziologice, downregularea receptorilor este un fenomen mult mai frecvent întâlnit și cu mult mai multe implicații în practica clinică. Acest fenomen explică de ce pentru obținerea unui efect terapeutic optim este frecvent necesar ca administrarea unor agenți terapeutici să se facă la intervale de timp mari sau inegale, așa cum se întâmplă în cazul nitraților.

18.1.5 Implicarea receptorilor celulari în patologia clinică

Absența sau anomaliile structurale sau funcționale ale unor receptori celulari, dar și prezența unor anticorpi îndreptați împotriva unor receptori celulari sunt frecvent incriminate în apariția unor afecțiuni frecvent întâlnite în practica clinică curentă.

Unul dintre cele mai elocvente exemple în acest sens este diabetul zaharat de tip 2, caracterizat de insulino-rezistență secundară scăderii numărului de receptori pentru insulină sau

defectele genetice responsabile de diverse anomalii structurale sau funcționale ale acestor receptori sau ale altor componente implicate în mecanismul de transducție a semnalului mediat de insulină. În pseudohipoparatiroidism, rezistența la parathormon este frecvent consecința unor defecte în structura proteinelor G responsabile de activarea adenilatciclazei ca răspuns la legarea parathormonului de receptor.

Multe dintre afecțiunile endocrine sunt rezultatul sintezei de autoanticorpi ai receptorilor celulari, responsabili de inactivarea, sau dimpotrivă stimularea, mecanismelor subsecven-te implicate în transducția semnalului. Diabetul zaharat de tip 1, consecința existenței de autoanticorpi îndreptați împotriva receptorilor de insulină, sau miastenia gravis, rezultatul sintezei de autoanticorpi îndreptați împotriva receptorilor de acetilcolină, sunt doar două exemple de afecțiuni în care existența de autoanticorpi blochează transducția semnalului și efectele intracelulare ale hormonului. Invers, în cazul pacienților cu boală Graves, lega-rea autoanticorpilor receptorilor pentru tireotropină (TSH) la receptorii tiroidieni de TSH determină activarea exagerată a secreției hormonilor tiroidieni triiodotironina și tiroxina.

Creșterea exagerată a numărului de receptori celulari a fost de asemenea implicată în proliferarea celulară necontrolată asociată neoplaziilor. Alteori, prezența în concentrații mult crescute a unor hormoni poate stimula receptori destinați altor hormoni înrudiți, producând efecte celulare nespecifice. În cazul pacienților cu acromegalie, concentrațiile mult crescute ale hormonului de creștere induce, pe lângă efectele specifice hormonului, și o serie de alte efecte nespecifice datorate activării neadecvate a receptorilor prolactinei. Același tip de anomalie poate fi observat la pacientele cu boală trofoblastică gestațională, la care nivelurile circulante crescute de hormon coriogonadotrofic pot induce hipertiroidism prin activarea neadecvată a receptorilor tiroidieni de TSH.

18.2 MECANISME SEMNAL INDEPENDENTE DE RECEPTORI – OXIDUL NITRIC

Cu toate că în marea majoritate a cazurilor efectele intracelulare ale liganzilor necesită legarea ligandului de receptor ca etapă intermediară în mecanismul de transducție a semnalului, o serie de molecule semnal cu greutate moleculară mică precum oxidul nitric au capacita-tea de a difuza prin membrana celulară și de a modifica activitatea catalitică a regiunilor transmembranare sau citoplasmatică ale unor enzime cu rol în transducția semnalului, fără intervenția unor receptori membranari.

Oxidul nitric, gaz diatomic hidrofob sintetizat de numeroase celule ale organismului, re-prezintă o importantă moleculă semnal, fiind implicat în multiple procese biologice esențiale pentru organismul uman, în special la nivelul sistemelor nervos și cardiovascular. Oxidul nitric este una dintre puținele molecule semnal cunoscute aflate sub formă gazoasă. De altfel, transmiterea semnalului de către o substanță gazoasă sintetizată de o celulă a organismului care traversează membranele celulare și reglează funcțiile altor celule ale organismului repre-zintă un mecanism de transducție a semnalului cu totul inedit în cadrul organismului uman.

În cea mai mare parte, oxidul nitric endogen este sintetizat din ariginină, sub acțiunea sintazelor oxidului nitric și în prezența oxigenului, dar și prin reducerea nitratului anorganic.

Odată sintetizat, acesta difuzează rapid prin membranele celulare, acționând asupra celulelor țintă și inducând efectele celulare specifice, în special relaxarea musculaturii netede vasculare, urmată de vasodilatație și creșterea fluxului sanguin local. Pe lângă difuzibilitatea crescută a oxidului nitric prin membrane, acest compus este de asemenea înalt reactiv și are un timp de înjumătățire scurt, de doar câteva secunde, aceste caracteristici explicând rolul central al oxidului nitric ca moleculă semnal în multiple procese paracrine și autocrine.

Capacitatea oxidului nitric de a influența un număr important de procese biologice celulare se datorează implicării sale în multiple căi de transducție a semnalului. Toate aceste căi sunt inițiate de legarea oxidului nitric de ioni de metale din structura unor proteine sau de atomi de sulf, ca cei din structura cisteinei. În ambele situații, această legare declanșează modificări alosterice ale proteinelor implicate, care, la rândul lor, declanșează formarea de mesageri secundari intracelulari. Aceste modificări includ oxidarea proteinelor care conțin fier precum ribonucleotid reductaza sau aconitaza, activarea guanilatciclazei solubile, ribozilarea ADP, nitrozilarea grupărilor sulfhidril sau activarea factorului reglator al fierului. Ținta cea mai comună a oxidului nitric pare a fi guanilatciclaza, o enzimă heterodimerică a cărei activare induce sinteza intracelulară de GMPc. Acesta din urmă activează la rândul său protein-kinaza G, care va determina fosforilarea și astfel inactivarea kinazei lanțului ușor al miozinei, ducând în final la defosforilarea lanțurilor ușoare de miozină și astfel la relaxarea mușchilor netezi.

De altfel, întregul efect vasodilatator atribuit nitroglicerinei se bazează pe conversia acesteia în oxid nitric. Alți agenți terapeutici precum sildenafil, vardenafil sau tadalafil își manifestă efectele vasodilatatoare prin amplificarea efectelor oxidului nitric endogen prin inhibarea enzimei care degradează GMPc.

18.3 MESAGERII SECUNZI

Sistemele de *mesageri secundari* reprezintă o componentă esențială pentru multiple mecanisme de transducție a semnalului. Prin intermediul acestora, o moleculă semnal difuzibilă este sintetizată rapid, putând activa ulterior o proteină efectoare aflată în interiorul celulei, în vederea declanșării răspunsului celular specific. Termenul de mesageri secundari este folosit pentru a diferenția aceste molecule de mesagerii primari, reprezentați de hormoni sau alte molecule, care nu pătrund în general în celula țintă, ci acționează doar la suprafața ei.

Majoritatea mesagerilor secundari sunt molecule de dimensiuni mici, având astfel capacitatea de a se deplasa rapid în citoplasmă, asigurând transmiterea rapidă a informației în interiorul celulei. Un număr important de liganzi extracelulari își manifestă efectul prin creșterea receptor-dependentă a concentrațiilor intracelulare ale unor mesageri secundari intracelulari precum AMPc, ionii de Ca^{2+} sau fosfoinozitidele. Ca și componente ale căilor de transmitere a semnalului, acești mesageri secundari participă la integrarea informației, sinteza și degradarea lor fiind puternic influențată de o serie de factori externi. În plus, un singur mesager secundar poate activa o multitudine de ținte subsecvente, realizând în acest mod amplificarea și extinderea semnalului inițial.

În funcție de proprietățile lor structurale, mesagerii secundari pot fi clasificați în una din următoarele trei categorii:

- Molecule hidrofobe – molecule insolubile în apă, precum DAG sau PIP. În stare bazală, aceste molecule sunt atașate membranelor celulare. Activarea receptorului de către ligandul specific determină migrarea acestor molecule în interiorul membranei celulare, unde pot interacționa și activa o serie de sisteme efectoare.
- Molecule hidrofile – molecule solubile în apă, precum AMP_c , GMP_c , IP_3 sau ioni de Ca^{2+} , cu localizare în citosol.
- Molecule gazoase – precum oxidul nitric sau monoxidul de carbon, care pot difuza liber prin citosol și membranele celulare.

Indiferent însă de proprietățile lor structurale, toate aceste molecule pot fi sintetizate și degradate prin reacții specifice în care sunt implicate enzime sau canale ionice, iar unele molecule, precum ioni de Ca^{2+} , pot fi stocate în organite celulare specializate, și eliberate rapid, în funcție de necesitățile organismului.

Studiile experimentale au permis descrierea detaliată a unui număr mare de mesageri secunzi precum nucleotidele ciclice AMP_c și GMP_c , ioni de Ca^{2+} , molecule derivate din fosfolipide (IP_3) și chiar molecule gazoase (oxid nitric).

În forma ei cea mai simplă, activarea sistemelor de mesageri secunzi poate fi rezultatul activării unor enzime, ca în cazul activării kinazelor, care conduc la sinteza nucleotidelor ciclice sau deschiderii unor canale ionice care permit influxul unor ioni precum ioni de Ca^{2+} . Aceste molecule își pot manifesta în continuare efectul prin fixarea și activarea altor molecule precum protein-kinazele, canalele ionice sau o gamă largă de alte proteine, contribuind astfel la desfășurarea cascadei de transducție a semnalului. Cu toate acestea, aceste modele nu sunt aplicabile tuturor mecanismelor de transducție a semnalului care implică participarea de mesageri secunzi. Astfel de exemple de sisteme mult mai complexe sunt cele care utilizează ca mesageri secunzi oxidul nitric sau diferiți compuși implicați în cascada acidului arahidonic.

18.3.1 ADENOSIN MONOFOSFATUL CICLIC

Adenosin monofosfatul ciclic este primul mesager secund identificat și caracterizat. Funcționând ca mesager secund intracelular, AMP_c mediază o serie de efecte hormonale precum mobilizarea energiei stocate intracelular prin degradarea carbohidraților în țesutul hepatic sau a trigliceridelor în celulele adipoase, efecte stimulate de catecolaminele β -adrenomimetice, conservarea apei la nivel renal mediată de vasopresină, homeostazia Ca^{2+} -ului reglată de parathormon sau creșterea frecvenței și forței de contracție miocardice sub acțiunea catecolaminelor β -adrenomimetice. Adenosin monofosfatul ciclic reglează de asemenea sinteza hormonilor steroidieni ca răspuns la corticotropină sau la hormonul foliculostimulant, dar și relaxarea mușchilor netezi și multe alte procese endocrine și nervoase, intervenind totodată în reglarea metabolismelor glucidic și lipidic.

Epinefrina și norepinefrina, prin acțiunea asupra receptorilor β -adrenergici, glucagonul, hormonul luteinizant, hormonul adrenocorticotrop, hormonul coriogonadotrop, hormonul foliculostimulant, histamina, prin acțiunea asupra receptorilor H_2 , hormonul melanocito-stimulator, parathormonul, prostaciclina, prostaglandina E_1 , serotonina, prin acțiunea asupra

receptorilor 5-HT_1 , TSH-ul și vasopresina, prin acțiunea asupra receptorilor V_1 , reprezintă hormoni care își exercită efectele biologice intracelulare prin intermediul mesagerului secund AMP_c .

Nivelul intracelular de AMP_c este determinat de balanța dintre sinteza și degradarea acestuia, dependente la rândul lor de activitatea a două enzime - *adenilataciclaza* și *fosfodiesterazele*. Ambele enzime sunt codificate de un număr mare de gene, care diferă în ceea ce privește profilurile de expresie și mecanismele de reglare. La mamifere au fost descrise cel puțin 9 tipuri diferite de adenilataciclază, degradarea AMP_c fiind reglată de nu mai puțin de 12 membri diferiți din marea familie a fosfodiesterazelor.

Adenilataciclaza, localizată la nivelul membranelor celulare, este enzima responsabilă de sinteza AMP_c din ATP (Figura 18.7).

Activarea adenilataciclazei este rezultatul activării receptorilor cuplați cu proteinele G_s de către diferiți liganzi specifici, în timp ce activarea receptorilor cuplați cu proteinele G_i inhibă activitatea acestei enzime. Sensibilitatea sistemelor dependente de adenilataciclază pentru diverși liganzi poate fi însă semnificativ diferită în diverse zone ale organismului. Astfel, adenilataciclaza hepatică răspunde mult mai puternic la stimularea de către glucagon comparativ cu adenilataciclaza musculară, care răspunde mai puternic la stimularea cu epinefrină.

Creșterea concentrației intracelulare de AMP_c declanșează răspunsul celular specific prin modificarea activității unor molecule intracitoplasmatiche, efecte mediate frecvent de *protein-kinaza A*, o protein-kinază AMP_c -dependentă care fosforilează o serie de proteine țintă, activează căi de transcripție genică, sau ambele.

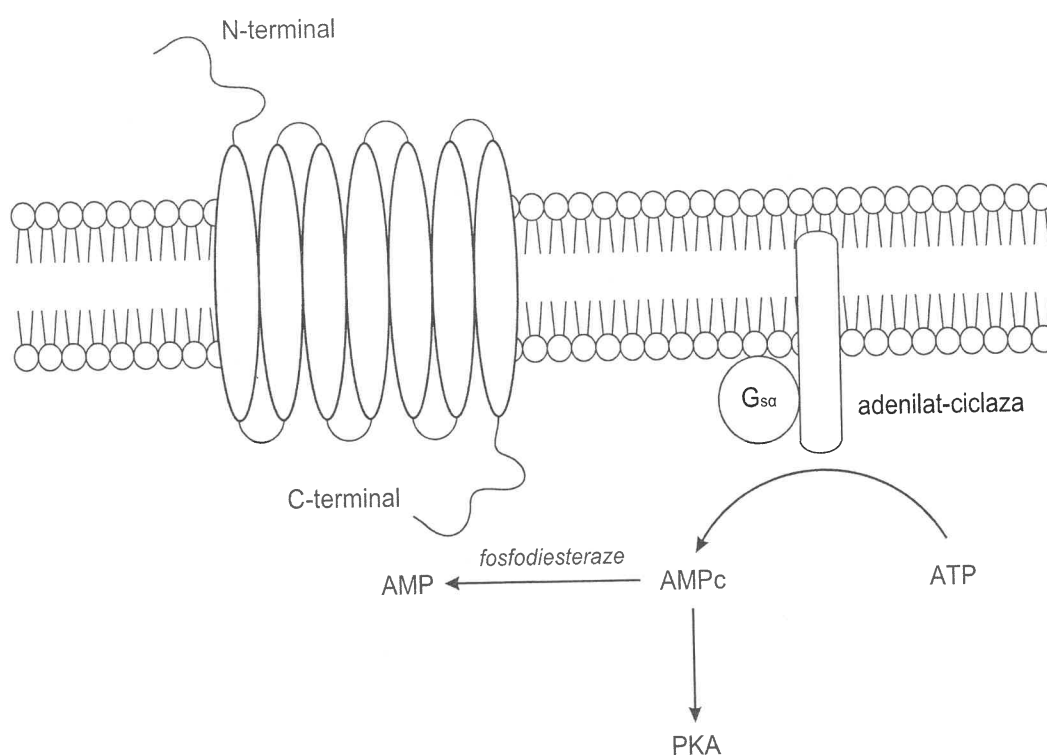


Figura 18.7 Sinteza AMP_c ca urmare a activării adenilataciclazei de către proteinele G_s

La concentrații intracelulare scăzute ale AMP_c , protein-kinaza A se găsește sub forma inactivă a unei enzime tetramerice formate din două subunități catalitice și două reglatoare, subunitățile reglatoare blocând situsul catalitic al subunităților catalitice. Subunitățile catalitice ale protein-kinazei A reprezintă situsurile active ale enzimei. Aceste situsuri conțin un domeniu de legare pentru ATP, ca sursă de molecule fosfat, dar și un domeniu de legare cu subunitățile reglatoare. Subunitățile reglatoare sunt reprezentate de două molecule legate între ele, cu orientare antiparalelă, formând un homodimer. Aceste subunități posedă două domenii de legare pentru AMP_c , un domeniu prin care interacționează cu subunitățile catalitice și un domeniu autoinhibitor care servește ca substrat pentru subunitățile catalitice.

Creșterea concentrației intracelulare de AMP_c sub acțiunea adenilatciclazei determină legarea AMP_c de situsurile specifice ale subunităților reglatoare ale protein-kinazei A și disocierea subunităților reglatoare de cele catalitice, cu activarea consecutivă a subunităților catalitice, care devin capabile să fosforileze proteinele substrat.

Subunitățile catalitice astfel activate catalizează transferul moleculelor de fosfat din structura ATP pe reziduurile specifice de serină sau treonină ale proteinelor substrat. Nu toate protein-kinazele citoplasmatiche răspund însă la stimularea AMP_c -dependentă. Un astfel de exemplu este protein-kinaza C, o protein-kinază AMP_c -independentă.

Întrucât fiecare moleculă de ligand poate stimula mai multe subunități α ale proteinelor G_s , acest model de transducție transmembranară a semnalului explică amplificarea semnalului inițial. Cu toate că protein-kinaza A se găsește într-un număr mare de celule ale organismului, efectele biologice ale stimulării acestei căi sunt extrem de variabile de la o celulă la alta. Această specificitate a efectelor AMP_c -dependente se datorează acțiunii kinazelor asupra unor substraturi proteice distincte, exprimate la nivelul diverselor celule ale organismului.

Cea mai mare parte a efectelor mediate de activarea protein-kinazei A au la bază fosforilarea unor enzime intracelulare, cu efecte stimulative sau inhibitoare asupra acestora. Frecvent, enzima fosforilată este ea însăși o kinază. Exemplul clasic este fosforilarea de către protein-kinaza A a fosforilaz-kinazei, enzimă care fosforilează la rândul ei glicogen-fosforilaza, având ca și consecință degradarea glicogenului în ficat și mușchi. Implicarea unei cascade de transducție a semnalului cu atât de multe etape duce la amplificarea semnalului inițial în cadrul fiecărei etape a cascadei, asigurând faptul că legarea unei mici cantități de ligand duce la eliberarea unui număr mare de molecule de glucoză. Pe de altă parte, fosforilarea de către protein-kinaza A a carboxilazei acetil-coenzimei A și a piruvat dehidrogenazei exercită un efect inhibitor asupra acestor enzime, inhibând lipogeneza și stimulând gluconeogeneza.

Protein-kinaza A activată este implicată de asemenea în activarea unor canale de Ca^{2+} localizate la nivelul membranelor celulelor musculare cardiace, activarea acestora fiind responsabilă de declanșarea contracției musculare. Un alt exemplu este activarea prin fosforilare de către protein-kinaza A a unui canal de Cl^- important în secreția apei la nivelul intestinului subțire.

Dincolo de aceste efecte, protein-kinaza A este capabilă de asemenea să activeze o serie de proteine cromozomale, histona H1 fiind de altfel prima țintă identificată a protein-kinazei A, dar și să fosforileze prin mecanism direct proteinele CREB (c-AMP-responsive-element-bin-

ding protein), proteine specifice care se leagă de regiuni promotoare ale ADN, promovând astfel creșterea expresiei unor gene și sinteza unor proteine specifice. Acest ultim mecanism necesită în general perioade lungi de timp, de ordinul orelor sau zilelor, pentru obținerea efectului final, sinteza proteică.

Această scurtă listă oferă doar câteva exemple de mecanisme în care protein-kinaza A joacă un rol esențial în procese precum metabolismul energetic, contracția musculară, transportul prin membrane sau expresia genică.

Activitatea AMP_c este întreruptă prin intervenția *fosfodiesterazelor* AMP_c -specifice, care determină hidroliza AMP_c la 5'-AMP. De altfel, inhibarea competitivă a degradării AMP_c de către fosfodiesteraze este unul dintre mecanismele prin care cafeina, teofilina și alte metilxantine își manifestă efectele biologice.

Superfamilia fosfodiesterazelor este subîmpărțită în 11 familii, diverse fosfodiesteraze aparținând aceleiași familii fiind înrudite funcțional, în ciuda faptului că secvența de aminoacizi poate fi considerabil diferită. În funcție de substratul activității lor, fosfodiesterazele pot fi clasificate în hidrolaze AMP_c -selective (fosfodiesterazele 4, 7 și 8) sau GMP_c -selective (fosfodiesterazele 5, 6 și 9), în timp ce altele pot hidroliza atât AMP_c cât și GMP_c (fosfodiesterazele 1, 2, 3, 10 și 11). În unele cazuri, legarea GMP_c la domeniul reglator are ca efect creșterea afinității și hidrolizei AMP_c , în detrimentul GMP_c . Acest mecanism permite reglarea încrucișată a căilor AMP_c - și GMP_c -dependente.

Prin efectele lor, fosfodiesterazele reglează localizarea, durata și intensitatea efectelor induse de nucleotidele ciclice. Astfel, fosfodiesterazele sunt factori reglatori importanți ai căilor de transducție a semnalului mediate de acești mesageri secundari. Rolul fosfodiesterazelor a fost demonstrat în multiple procese fiziologice și fiziopatologice precum reglarea activării plachetare, relaxării vasculare, contracției mușchiului cardiac sau inflamației.

Fosfodiesterazele sunt frecvent țintele inhibiției farmacologice datorită distribuției tisulare unice, dar și proprietăților lor structurale și funcționale. Inhibitorii neselectivi de fosfodiesteraze, precum teofilina sau papaverina, au fost utilizați ca agenți terapeutici pentru mai bine de 70 de ani într-o serie de afecțiuni. În ultima decadă, eficacitatea inhibitorilor selectivi de fosfodiesteraze a fost evaluată într-o serie de circumstanțe clinice, inclusiv utilitatea inhibitorilor de fosfodiesterază 2 în tratamentul sepsisului sau a inhibitorilor de fosfodiesterază 4 în tratamentul astmului bronșic, rinitei alergice, psoriazisului, sclerozei multiple, depresiei, bolii Alzheimer și schizofreniei. Pe măsură ce cunoștințele noastre în legătură cu mecanismele de acțiune ale acestor inhibitori selectivi de fosfodiesteraze se îmbogățesc, în paralel cu dezvoltarea unor inhibitori cu selectivitate crescută, este de așteptat să se identifice droguri cu acțiuni terapeutice superioare.

Inhibarea de către amrinonă, milrinonă sau enoximonă a fosfodiesterazelor de tip 3, prezente în special la nivelul miocardului, determină creșterea concentrațiilor intracelulare de AMP_c și consecutiv creșterea forței de contracție a mușchiului cardiac prin fosforilarea dependentă de protein-kinaza A a canalelor de Ca^{2+} de tip L de la nivelul cardiomiocitelor, cu creșterea consecutivă a concentrației Ca^{2+} -ului intracelular. Pe lângă efectele cardiace, acești

agenți prezintă și proprietăți vasodilatatoare și bronhodilatatoare. Cilostazolul, un alt agent inhibitor al fosfodiesterazei 3, a fost asociat cu un efect de creștere a plasticității hematiilor, benefic în special la pacienții cu claudicație intermitentă.

Fosfodiesterazele de tip 4, implicate în inactivarea preferențială a AMP_c , sunt prezente în multe celule implicate în procesele de inflamație și în imunitate. Inhibitorii specifici ai acestor fosfodiesteraze, de tipul cilomilastului sau roflumilastului, au demonstrat efecte benefice atunci când au fost administrați la pacienți cu astmul bronșic sau bronhopneumopatie cronică obstructivă.

Activitatea anormală a mecanismelor de transducție a semnalului AMP_c -dependente și activarea aberantă a genelor a căror transcripție se realizează prin mecanisme AMP_c -dependente au fost implicate în dezvoltarea unor forme de neoplazii. Există de asemenea date care sugerează că AMP_c joacă un rol central în procesul gândirii complexe la nivelul cortexului prefrontal, prin intermediul canalelor ionice activate de hiperpolarizare legate de nucleotidele ciclice, a căror deschidere AMP_c -dependentă interferă cu funcția cortexului prefrontal.

18.3.2 GUANOZIN MONOFOSFATUL CICLIC

Guanozin monofosfatul ciclic este un nucleotid ciclic derivat din GTP. Sinteza GMP_c este catalizată de guanilatciclază, enzimă cu localizare membranară sau intracelulară, care asigură conversia GTP în GMP_c (Figura 18.8). Guanilatciclaza membranară este activată prin legarea

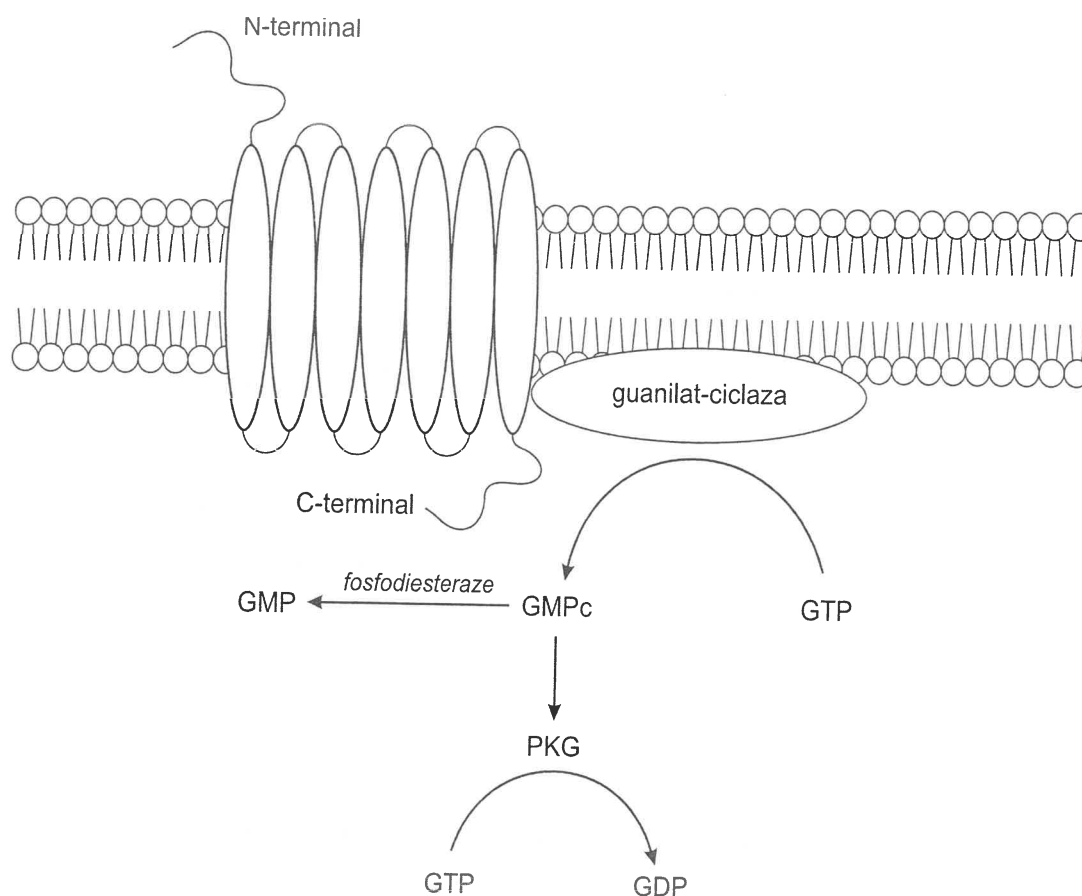


Figura 18.8 Sinteza GMP_c sub acțiunea guanilatciclazei

unor hormoni peptidici precum factorul natriuretic atrial de receptorii transmembranari specifici, în timp ce guanilatciclaza solubilă este stimulată în special de oxidul nitric.

Similar AMP_c , GMP_c funcționează ca și mesager secund în special prin activarea unor protein-kinaze intracelulare ca răspuns la legarea hormonilor de natură proteică la receptorii transmembranari. Spre deosebire însă de AMP_c , mesager secund ubicuitar implicat în transducția unui număr mare de semnale, GMP_c este un mesager înalt specializat, cu roluri bine stabilite în transducția semnalului la nivelul unui număr redus de tipuri celulare. Mecanismele de transducție a semnalului GMP_c -dependente sunt implicate în reglarea conductanței unor canale ionice, glicogenolizei și apoptozei celulare.

Legarea liganzilor de receptorii transmembranari specifici stimulează guanilatciclaza membranară, determinând conversia GTP în GMP_c . La rândul său, GMP_c stimulează o protein-kinază GMP_c -dependentă (*protein-kinaza G*), enzimă cu structură dimerică alcătuită dintr-o unitate catalitică și una reglatoare. La concentrații intracelulare mici ale GMP_c , unitatea reglatoare a protein-kinazei G blochează situsurile active ale subunității catalitice. Creșterea concentrației intracelulare de GMP_c sub acțiunea guanilatciclazei determină legarea GMP_c la situsurile subunității reglatoare ale protein-kinazei G și activarea subunităților catalitice, permițându-le acestora să fosforileze o serie de proteine substrat. Spre deosebire însă de protein-kinaza A, implicată în medierea semnalului AMP_c -dependent, activarea protein-kinazei G nu induce disocierea subunităților reglatoare ale enzimei de cele catalitice.

La nivelul mușchiului neted vascular, stimularea guanilatciclazei poate fi rezultatul legării unui ligand precum factorul natriuretic atrial la nivelul receptorului transmembranar specific, dar și a creșterii concentrației factorului de relaxare derivat endotelial (oxidul nitric), ca răspuns la acțiunea indirectă a unor mediatori precum acetilcolina sau histamina. Activarea indusă de GMP_c a protein-kinazei G este urmată de fosforilarea kinazei lanțurilor ușoare de miozină, responsabilă de relaxarea mușchiului neted vascular și de vasodilația consecutivă. La nivelul mucoasei intestinale, mecanismul de transducție a semnalului GMP_c -dependent se desfășoară în strict paralelism cu cel AMP_c -dependent.

La fel ca și în cazul AMP_c , activitatea GMP_c este întreruptă prin degradarea enzimatică a GMP_c sub acțiunea *fosfodiesterazelor* GMP_c -specifice, care determină hidroliza GMP_c la 5'-GMP și defosforilarea substraturilor kinazei. Degradarea GMP_c de către fosfodiesteraze este o etapă importantă în procesul de fototransducție, la nivelul analizatorului vizual. În fotoreceptorii oculari, prezența luminii stimulează fosfodiesterazele specifice, promovând degradarea GMP_c . Canalele de Na^+ ale acestor fotoreceptori fac parte din grupul proteinelor GMP_c -dependente, degradarea GMP_c determinând închiderea canalelor de Na^+ , producând hiperpolarizare și transmiterea informației vizuale spre creier.

Inhibitorii de fosfodiesteraze previn degradarea GMP_c , amplificându-i și prelungindu-i efectele. Agenții care blochează selectiv fosfodiesteraza 5 și astfel hidroliza GMP_c de tipul sildenafilului, s-au dovedit utili în tratamentul disfuncției erectile. Rolul inhibitorilor selectivi de fosfodiesterază 5 a fost evaluat și în tratamentul disfuncției sexuale la femei sau al hipertensiunii pulmonare.

18.3.3 IONUL DE CALCIU

Ionul de Ca^{2+} este un mesager secund ubicuitar, jucând un rol important în transducția semnalului prin implicarea sa în procese de motilitate celulară, fertilizare a ovulului, neurotransmitere și secreție proteică, dar și în procese de fuziune, diferențiere și proliferare celulară, reglare a activității enzimatică, a pompelor ionice și a componentelor citoscheletului.

Capacitatea ionului de Ca^{2+} de a interveni în mecanismele de transducție a semnalului se bazează pe influxul transmembranar de Ca^{2+} realizat prin activarea unor canale ionice transmembranare, dar și pe rolul său de mesager secund implicat în mecanisme de transducție a semnalului mediate de receptori cuplați cu proteine G_q . Odată pătruns în spațiul intracelular, Ca^{2+} exercită efecte reglatoare alosterice asupra unui număr important de enzime și proteine intracelulare.

În condiții bazale, concentrația Ca^{2+} -ului în spațiul extracelular (de ordinul a 10^{-3} moli/L) este mult superioară concentrației Ca^{2+} -ului intracelular (de ordinul a 10^{-7} moli/L). Acest gradient de concentrație important între spațiile extra- și intracelular permite realizarea unor schimburi rapide de Ca^{2+} între spațiul extra- și cel intracelular, dar și între diverse depozite intracelulare de Ca^{2+} și citoplasma celulelor. Creșterea rapidă (în interval de câteva secunde) a concentrației Ca^{2+} -ului intracelular până la valorile micromolare necesare manifestării efectelor biologice poate fi rezultatul unui număr important de mecanisme de transducție a semnalului. Activarea canalelor transmembranare de Ca^{2+} voltaj-dependente permite pătrunderea în celulele musculare netede, striate, neuroni, dar și în receptori gustativi pentru gustul sărat a unei cantități mici de Ca^{2+} , insuficiente pentru a declanșa un răspuns celular adecvat, dar suficiente pentru a declanșa eliberarea suplimentară de Ca^{2+} de la nivelul reticulului endoplasmic prin activarea receptorilor ryanodinici, fenomen cunoscut sub numele de eliberare de Ca^{2+} indusă de Ca^{2+} . La nivel neuronal, creșterea concentrațiilor intracelulare de Ca^{2+} poate fi de asemenea rezultatul activării canalelor ionice ligand-dependente de la nivelul membranelor postsinaptice, în timp ce la nivelul celulelor musculare netede creșterea concentrațiilor intracelulare de Ca^{2+} este frecvent rezultatul legării ligandului de receptori cuplați cu proteinele G_q și eliberării IP_3 -induse a Ca^{2+} -ului de la nivelul reticulului sarcoplasmic.

Reducerea concentrației intracelulare de Ca^{2+} și revenirea la gradientul transmembranar de repaus se realizează în mare măsură prin intervenția unor sisteme de transport, cu consum important de energie. Astfel, concentrația intracelulară de Ca^{2+} poate fi redusă prin sechestrarea Ca^{2+} -ului la nivelul reticulului endoplasmic sub acțiunea ATP-azei de Ca^{2+} a reticulului endoplasmic, urmată de fixarea Ca^{2+} -ului de proteine care leagă Ca^{2+} de tipul calsequestrinei; prin expulzarea Ca^{2+} -ului din celulă sub acțiunea antiportului $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, a cărui funcționare depinde de cea a ATP-azei Na^+/K^+ -dependente și în mai mică măsură sub acțiunea ATP-azei sarcolemale de Ca^{2+} ; dar și prin sechestrarea unei mici cantități de Ca^{2+} la nivelul mitocondriilor, pe baza energiei generate de gradientul electrochimic.

Efectele induse de creșterea concentrațiilor intracelulare de Ca^{2+} sunt dependente de tipul celular, incluzând activarea contracției musculare, prin legarea de troponină ionii de Ca^{2+} favorizând interacțiunea dintre microfilamentelor de actină și miozină ale acestor celu-

le; eliberarea de neurotransmițători la nivelul sinapselor neuronale; secreția unor hormoni precum insulina, ca răspuns la stimularea celulelor β -pancreatice; procesele de apoptoză, dar și o serie de procese metabolice celulare; adeziunea celulelor la matricea extracelulară; activarea limfocitelor T și B implicate în răspunsul imun; procese inflamatorii; dar și memoria de lungă și scurtă durată.

Multe dintre evenimentele intracelulare dependente de Ca^{2+} se produc prin activarea de către acesta a proteinei reglatoare *calmodulina*.

Calmodulina (CALcium MODULated proteIN) este o proteină cu greutate moleculară de 17 kDa, distribuită în toate celulele organismului uman. Molecula de calmodulină este alcătuită din două structuri globulare similare, unite printr-un α -helix de dimensiuni mari (65 Å), fiecare lob globulinic având două situsuri de legare a Ca^{2+} -ului, la distanță de 11 Å una față de cealaltă. Calmodulina poate fixa la nivelul situsurilor specifice până la 4 ioni de Ca^{2+} , acest proces declanșând modificări posttranslaționale ale proteinei precum fosforilare, acetilare, metilare sau clivaj proteolitic, fiecare dintre aceste procese modulându-i acțiunea. Multe dintre proteinele de care se leagă calmodulina sunt de altfel incapabile de a lega direct Ca^{2+} , calmodulina acționând astfel ca un senzor de Ca^{2+} și ca un element de legătură în cadrul mecanismului de transducție a semnalului.

Legarea a 3 sau 4 ioni de Ca^{2+} , fenomen care se produce atunci când nivelul intracelular de Ca^{2+} crește la circa 500 nmoli/L, induce o modificare conformațională importantă a calmodulinei, care îi va permite să fixeze și să modifice o serie de proteine țintă precum protein-kinazele Ca^{2+} /calmodulin-dependente, responsabile de fosforilarea reziduurilor proteice de serină și treonină. Protein-kinaza II Ca^{2+} /calmodulin-dependentă, una dintre țintele preferențiale ale calmodulinei, este o kinază cu specificitate largă implicată în reglarea metabolismului energetic, permeabilității ionice, biologiei neurotransmițătorilor, activității kinazei lanțurilor ușoare de miozină și a fosforilaz-kinazei. Deși calmodulina servește ca unitate reglatoare permanentă a fosforilaz-kinazei, ea poate regla și o serie de efectori non-kinazici precum unele izoforme ale adenilatciclazei sau diferite fosfodiesteraze AMP_c -dependente, evidențiind interacțiunea dintre căile semnal AMP_c - și cele Ca^{2+} -dependente.

Legarea unui număr mare de ioni de Ca^{2+} permite realizarea unei activări mai intense a calmodulinei. Astfel, mici modificări în concentrația Ca^{2+} -ului intracelular pot cauza modificări importante în concentrația calmodulinei activate de Ca^{2+} , determinând amplificarea semnalului inițial.

18.3.4 INOZITOL 1, 4, 5-TRIFOSFATUL ȘI DIACILGLICEROLUL

Membrana celulară conține, în concentrații mici, o serie de fosfoinozitide - lipide care pot fi convertite sub acțiunea unor enzime în mesageri secunzi. Ca și componente integrate în membrana celulară, aceste fosfoinozitide se găsesc în imediata vecinătate a unor receptori transmembranari și pot interacționa cu ușurință cu aceștia.

Principalul fosfoinozitud membranar implicat în mecanismele de transducție a semnalului este *fosfatidilinozitolul*. Sub acțiunea a două kinaze asociate membranelor celulare, fosfa-

tidilinozitol-kinaza 4 și fosfatidilinozitol-kinaza 5, fosfatidilinozitolul este convertit la nivelul membranei celulare în *fosfatidilinozitol 4,5-difosfat* (PIP_2). Acesta din urmă, deși este un component fosfolipidic minor al membranelor celulare, reprezentând circa 0,4% din totalul fosfolipidelor membranare, reprezintă un important substrat pentru un număr mare de proteine semnal. Sub acțiunea *fosfolipazei C- PIP_2 -specifice*, PIP_2 este convertit la rândul său în doi mesageri secundari, IP_3 și DAG (Figura 18.9).

O serie de hormoni precum acetilcolina, prin acțiunea asupra receptorilor colinergici muscarinici, angiotensina, calcitonina, catecolaminele, prin acțiunea asupra receptorilor α_1 -adrenergici, peptidele opioide, factorul de creștere derivat plachetar, serotonina, prin acțiunea asupra receptorilor 5-HT_2 , somatostatina, hormonul eliberator de TSH și vasopresina, prin acțiunea asupra receptorilor V_2 , își manifestă efectele prin intermediul acestor mesageri secundari. În timp ce majoritatea liganzilor care intervin în conversia PIP_2 în IP_3 și DAG se leagă de receptori cuplați cu proteinele G_q , alți liganzi acționează prin activarea receptorilor tirozin-kinazici. Indiferent însă de mecanismul implicat în transducția semnalului acestor liganzi, etapa comună este reprezentată de stimularea fosfolipazei C, care va promova hidroliza PIP_2 în IP_3 și DAG.

Sinteza IP_3 din PIP_2 este urmată la scurt timp de difuziunea intracelulară a acestuia și fixarea sa la nivelul receptorilor specifici de la nivelul reticulului endoplasmic, pe care îi

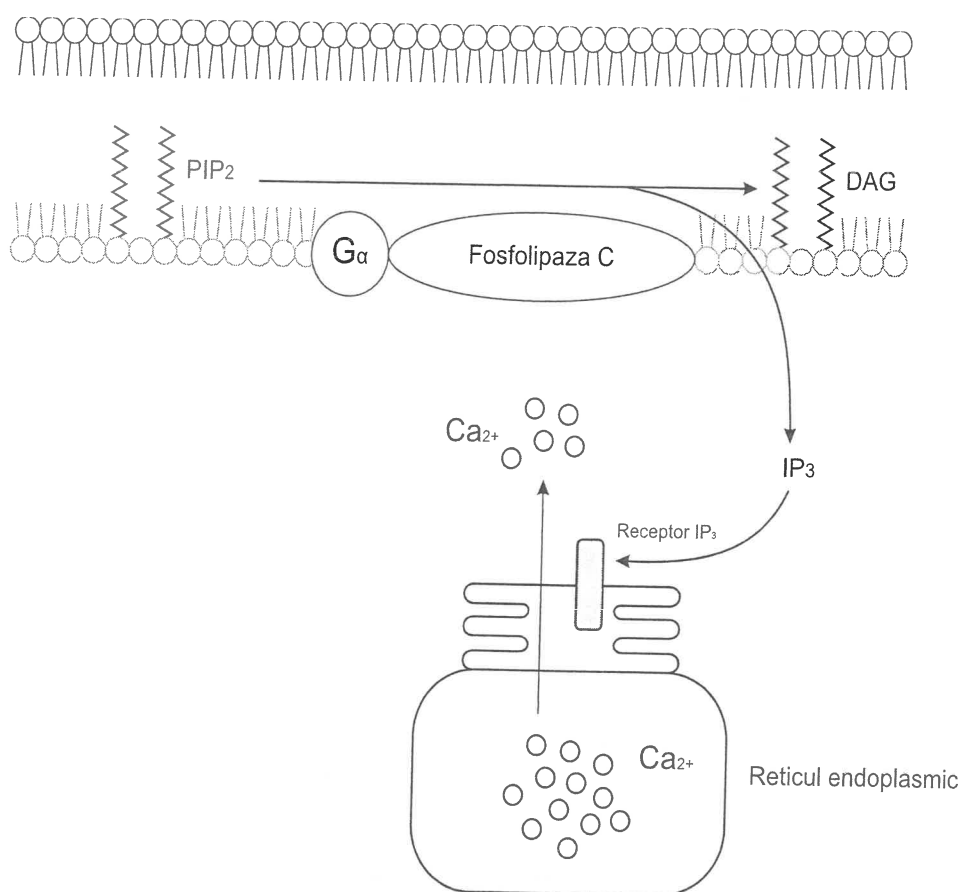


Figura 18.9 Generarea inozitol 1, 4, 5-trifosfatului (IP_3) și a diacilglicerolului (DAG) din fosfatidilinozitol 4,5-difosfat (PIP_2) prin activarea fosfolipazei C

activează. Acești receptori, având o masă moleculară de circa 250 kDa și un număr de șase domenii transmembranare, sunt prezenți la suprafața reticulului endoplasmic al tuturor celulelor organismului uman. În forma lor activă, acești receptori sunt exprimați sub forma unor multimeri alcătuiți din patru molecule receptoare de IP₃ fiecare. Această structură tetramerică induce deschiderea canalelor de Ca²⁺ ale reticulului endoplasmic, canale diferite de canalele de Ca²⁺ ryanodin-sensibile implicate în mecanismul eliberării de Ca²⁺ induse de Ca²⁺ mediat de canalele de Ca²⁺ voltaj-dependente, determinând eliberarea unor cantități importante de Ca²⁺ din reticulul endoplasmic în citoplasma acestor celule. Acest mecanism de mobilizare a Ca²⁺ sub acțiunea IP₃ este principalul mecanism responsabil de contracția fibrelor musculare netede.

Activarea acestui sistem de transducție a semnalului se produce de obicei în prezența unor concentrații ale ligandului de ordinul a câțiva nanomoli/L. Această mică cantitate de ligand este suficientă pentru a genera 2-3 mmoli/L de IP₃, care la rândul lor vor determina eliberarea a 20-30 de ioni de Ca²⁺ de la nivelul reticulului endoplasmic, această relație scoțând în evidență puternicul efect amplificator al acestui mecanism de transducție a semnalului.

Sinteza extrem de rapidă (în mai puțin de o secundă) și eliminarea extrem de rapidă ($t_{1/2}$ de 4 secunde în ficat) a IP₃, care preced creșterea concentrațiilor intracelulare de Ca²⁺, susțin implicarea IP₃ ca messenger secund în cadrul acestui proces de mobilizare a Ca²⁺-ului. De altfel, microinjectarea de molecule de IP₃ în celule sau simpla adăugare de IP₃ în timpul procesului de incubare a celulelor în cadrul experimentelor *in vitro* a fost asociată cu mobilizarea Ca²⁺-ului din reticulul endoplasmic al acestor celule, în absența stimulării hormonale.

Similar caracterului tranzitor al eliberării intracelulare de Ca²⁺ ca răspuns la legarea ligandului de receptor, concentrațiile intracelulare de IP₃ revin rapid la valorile de repaus prin intervenția mai multor căi de degradare.

Spre deosebire de IP₃, după sinteza sa din PIP₂, DAG rămâne ancorat membranei celulare, îndeplinindu-și rolul de messenger secund prin activarea *protein-kinazelor C*, o superfamilie de kinaze înrudite cu diverse distribuții la nivel tisular și cu diferite căi de activare.

Protein-kinazele C sunt reprezentate de 10 izoenzime, clasificate, pe baza messengerului secund pe care îl utilizează, în 3 subfamiii: clasice, noi și atipice. Proteinikinazele clasice, care cuprind izoformele α , β I, β II și γ , necesită prezența Ca²⁺-ului, DAG-ului și a unui fosfolipid precum fosfatidilcolina pentru a fi activate. Protein-kinazele noi includ izoformele δ , ϵ , η și θ , necesitând DAG, dar nu și Ca²⁺, pentru a fi activate. Spre deosebire de acestea, protein-kinazele C atipice, incluzând izoformele M ξ și ι/λ , nu necesită nici Ca²⁺, nici DAG pentru a fi activate.

Indiferent însă de messengerul secund care stă la baza activării lor, toate aceste protein-kinaze C sunt alcătuite din două structuri majore: situsul amino-terminal, cu rol reglator, și situsul carboxi-terminal, o kinază cu activitate catalitică. În absența messengerului secund, situsul reglator al enzimei ocupă domeniul de legare a substratului de la nivelul situsului catalitic, blocând astfel activitatea protein-kinazei C. Legarea messengerului secund reduce afinitatea legăturii dintre situsul reglator și cel catalitic, inducând modificări conformațio-

nale ale protein-kinazei C care vor permite activarea acestora și fosforilarea consecutivă a reziduurilor serină și treonină ale proteinelor țintă. Cu toate că protein-kinaza C poate fosforila aceleași proteine țintă ca și protein-kinaza A, protein-kinaza C fosforilează de obicei reziduurile de serină, în timp ce protein-kinaza A fosforilează cel mai frecvent reziduurile de treonină ale acestor proteine.

Mecanismele de transducție a semnalului mediate de DAG prin intermediul protein-kinazei C au fost implicate în procese precum desensibilizarea receptorilor, reglarea transcripției genice, medierea răspunsului imun, reglarea creșterii celulare, dar și în procesele de învățare și memorie. Întrucât substratul proteic disponibil pentru fosforilare variază, efectele protein-kinazei C sunt semnificativ diferite în funcție de tipul celular. Astfel, acest sistem dependent de protein-kinaza C intervine la nivelul tractului digestiv în contracția sfincterelor, la nivelul sistemului vizual în contracția mușchilor dilatatori și constrictori ai irisului, dar și în contracția mușchilor ciliari, la nivelul aparatului urinar în contracția sfincterului uretral, contracția ureterelor și a vezicii urinare, dar și în contracția miometrului, a mușchilor erectori ai firelor de păr, în vasoconstricție, ejaculare, bronhoconstricție, neurotransmitere, agregare plachetară, stimularea secreției lichidului cefalorahidian, a secreției salivare, sudoripare și a secreției gastrice acide, precum și în gluconeogeneză și glicogenoliză.

Una dintre principalele caracteristici funcționale ale protein-kinazelor C este durata lor lungă de acțiune, acestea rămânând activate chiar după ce activarea inițială, ligand-dependentă, a încetat. Acest fapt se datorează în mare parte existenței unor receptori de rezervă, a căror activare induce sinteza suplimentară de DAG prin fosforilarea dependentă de fosfolipaza C a fosfatidilcolinei și fosfatidiletanolaminei ca răspuns la factori de creștere sau mitogeni. În final, DAG va fi inactivat fie prin deacilare sub acțiunea DAG-lipazei, cu formarea acidului arahidonic, fie prin fosforilare sub acțiunea DAG-kinazei, cu formare de acid fosfatidic. La rândul său, acidul fosfatidic format va putea fi reconvertit ulterior în fosfolipide, inclusiv DAG, sub acțiunea fosfohidrolazei acidului fosfatidic.

18.3.5 ACIDUL ARAHIDONIC

Din punct de vedere structural, *acidul arahidonic* este un acid gras polinesaturat cu 20 de atomi de carbon și 4 legături duble, prezent în fosfolipidele membranelor celulare, în special în fosfatidiletanolamină, fosfatidilcolină și fosfatidilinozotide, dar și în țesutul cerebral.

Pe lângă implicarea sa în cadrul proceselor inflamatorii, acidul arahidonic reprezintă un important mesager secund de natură lipidică necesar pentru reglarea activității unor enzime semnal precum fosfolipaza C- γ , fosfolipaza C- δ sau protein-kinaza C, izoformele α , β și γ .

În absența ligandului, acidul arahidonic este stocat la nivelul membranelor celulare esterificat la glicerol, sub formă de fosfolipide.

Legarea ligandului de receptorii specifici cuplați cu proteinele G determină hidroliza fosfolipidelor membranare și sinteza de acid arahidonic sub acțiunea fosfolipazelor membranare. Cu toate că această reacție de deacilare a fosfolipidelor la acid arahidonic poate fi mediată de trei tipuri diferite de fosfolipaze, fosfolipazele A₂, C și D, fosfolipazele C și D nu eliberează

acidul arahidonic în mod direct, ci sintetizează doi produși lipidici ce conțin acid arahidonic, DAG și acid fosfatidic. Acești compuși pot elibera ulterior acidul arahidonic sub acțiunea DAG-lipazei și monoacilglicerol-lipazei, acidul arahidonic astfel format putând urma trei căi: reîncorporarea în fosfolipide, difuziunea în spațiul extracelular sau metabolizarea. Spre deosebire de fosfolipazele C și D, fosfolipaza A_2 catalizează hidroliza fosfolipidelor membranare în poziția 2, determinând sinteza de acid arahidonic printr-o reacție într-un singur pas.

În funcție de mecanismele în care urmează a fi implicat, inflamatorii respectiv de mediere a transducției semnalului, acidul arahidonic poate fi sintetizat din fosfolipidele membranare prin intervenția a două tipuri diferite de *fosfolipază* A_2 . Acidul arahidonic implicat în mecanismele de transducție a semnalului este generat sub acțiunea fosfolipazei A_2 citosolice fosfatidilcolin-specifice, având o masă moleculară de 85 kDa și a cărei activitate este reglată prin fosforilarea reziduurilor serină. Spre deosebire de acesta, acidul arahidonic implicat în procesele inflamatorii este generat sub acțiunea fosfolipazei A_2 cu greutate moleculară mică, de 14 – 18 kDa, prezentă în concentrații mari în veninul de șarpe și în suc pancreatic. În plus, acidul arahidonic poate fi rezultatul deacilării DAG, sub acțiunea DAG-lipazei.

Odată sintetizat, acidul arahidonic va fi metabolizat sub acțiunea a diferite enzime, având ca rezultat sinteza unei game foarte variate de compuși cunoscuți sub numele generic de *eicosanoizi* (Figura 18.10):

- Metabolizarea acidului arahidonic sub acțiunea enzimelor *ciclooxigenază* și *peroxidază* duce la formarea *prostaglandinei* H_2 , care va fi utilizată la rândul ei

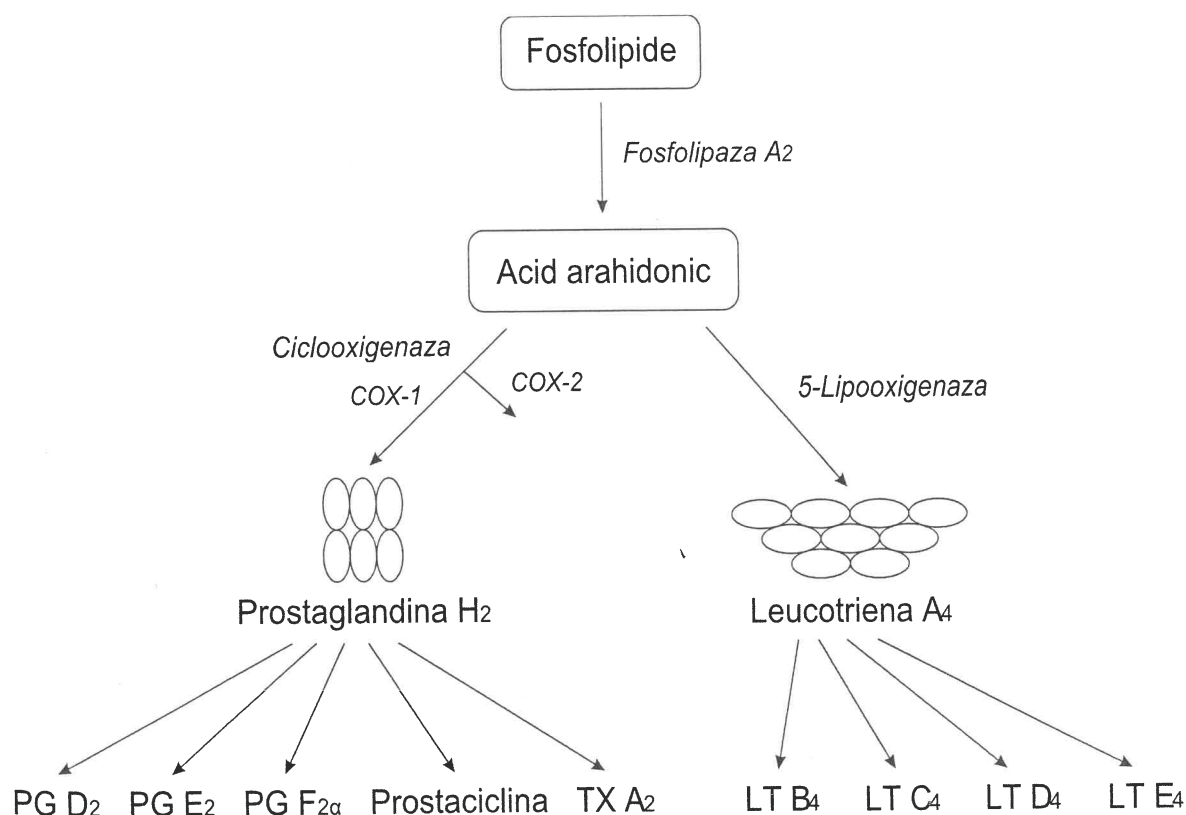


Figura 18.10 Etapele formării prostaglandinelor, tromboxanilor și leucotrienelor din acidul arahidonic sintetizat din fosfolipidele membranare sub acțiunea fosfolipazei A_2

- pentru sinteza prostaglandinelor, prostaciclului și tromboxanilor.
- Metabolizarea acidului arahidonic sub acțiunea enzimei *5-lipoxygenază* duce la formarea acidului 5-hidroperoxieicosatetraenoic, utilizat la rândul său pentru sinteza de *leucotriene*.
- Metabolizarea acidului arahidonic sub acțiunea epoxigenazei duce la formarea acizilor hidroxicicosatetraenoic și epoxieicosatrienoic.

O parte din acidul arahidonic sintetizat va fi utilizat de asemenea pentru sinteza de anandamide.

Căile implicate în sinteza acestor compuși și acțiunea acestora la nivelul organismului sunt cunoscute sub numele de *cascada acidului arahidonic*. O serie de produși rezultați prin aceste căi, aparținând clasei eicosanoizilor, sunt implicați în modularea activității unor canale ionice, pompe ionice sau protein-kinaze. Sunt descrise patru familii de eicosanoizi: prostaglandinele, prostaciclul, tromboxanii și leucotrienele. Pentru fiecare dintre aceste patru familii au fost descrise două sau trei serii separate, derivate din acizii grași $\omega 3$, respectiv $\omega 6$. Efectele biologice diferite ale stimulării diferitelor familii de eicosanoizi explică astfel efectele diferite ale acizilor grași $\omega 3$ și $\omega 6$ asupra stării de sănătate a organismului.

Din punct de vedere funcțional, eicosanoizii pot acționa autocrin, asupra celulei la nivelul căreia au fost sintetizați, paracrin, asupra celulelor învecinate, dar și la distanță de celula de origine. Acești compuși nu sunt stocați la nivelul celulelor de origine, ci sunt sintetizați în funcție de necesitățile organismului, durata lor de viață variind de la câteva secunde la câteva minute.

Activitatea eicosanoizilor în cadrul mecanismelor de transducție a semnalului este mediată de legarea acestora la nivelul receptorilor cuplați cu proteinele G. Prin activarea acestor receptori, eicosanoizii participă la o gamă variată de efecte biologice precum modularea contractilității mușchilor netezi (tonusul vascular), agregarea plachetară, secreția acidă gastrică, echilibrul hidrosodat, dar și medierea durerii și a proceselor inflamatorii. Mai mult decât atât, studiile experimentale au demonstrat de asemenea implicarea prostaglandinelor în controlul unor procese complexe precum sarcina, proliferarea neoplazică sau metastazarea cancerului de colon.

Prima etapă în conversia acidului arahidonic în *prostaglandine* implică formarea unui inel ciclopentan și introducerea a 4 atomi de oxigen în molecula acidului arahidonic sub acțiunea ciclooxygenazei, cu formarea metabolitului intermediar prostaglandina G_2 . Ulterior, hidroperoxidaza va cataliza reducerea a 2 electroni din grupul 15-hidroperoxi de la nivelul moleculei de prostaglandină G_2 la 15-hidroxil, cu generarea metabolitului extrem de instabil prostaglandina H_2 , care poate fi convertit ulterior în alte prostaglandine, prostaciclul și tromboxanii. Prostaglandinele astfel sintetizate mediază o gamă variată de răspunsuri fiziologice și fiziopatologice precum inflamația, reglarea fluxului sanguin spre organe precum rinichii, controlul transportului transmembranar al ionilor sau modularea transmiterii sinaptice, fiind implicate totodată în inducerea somnului. Sunt descrise două izoforme ale enzimei ciclooxygenază: ciclooxygenaza-1, enzimă în cea mai mare parte constitutivă, localizată la nivelul plachetelor, stomacului și rinichilor, și ciclooxygenaza-2, enzimă în principal inductibilă, responsabilă de

producerea prostaglandinelor inflamatorii. Mecanismul de acțiune al aspirinei, unul dintre cei mai larg utilizați agenți antiinflamatori, se bazează pe inhibarea enzimei ciclooxigenază și blocarea consecutivă a sintezei prostaglandinelor la nivelul primei etape, în cadrul căreia acidul arahidonic este convertit în precursorul comun al prostaglandinelor, prostaglandina G_2 . Aspirina modifică covalent și inactivează ireversibil ambele izoforme ale ciclooxigenazei printr-o reacție de acetilare. Întrucât inactivarea ciclooxigenazei va bloca simultan și producerea tromboxanului A_2 , un vasoconstrictor potent și un stimulator important al agregării plachetare derivat tot din precursorul comun prostaglandina G_2 , aspirina prezintă importante beneficii și în prevenirea trombozelor, în special arteriale.

Sub acțiunea 5-lipooxigenazei, acidul arahidonic este convertit într-o altă clasă de eicosanoizi, *leucotrienele*, având importante proprietăți vasoactive și proinflamatorii. Această cale a 5-lipooxigenazei este activă la nivelul leucocitelor, incluzând mastocitele, eozinofilele, neutrofilele, monocitele și bazofilele. Activarea acestor celule inițiază conversia acidului arahidonic în leucotriena A_4 , enzima 5-lipooxigenază mediind primele etape în sinteza leucotrienelor. Această enzimă prezintă atât activitate dioxigenazică, asigurând conversia acidului arahidonic în acid 5-hidroperoxieicosatetraenoic, cât și dehidrogenazică, asigurând conversia acidului 5-hidroperoxieicosatetraenoic în leucotriena A_4 , un epoxid instabil.

În celulele care exprimă enzima leucotriena A_4 -hidrolază, precum neutrofilele sau monocitele, leucotriena A_4 va fi convertită în leucotriena B_4 , un puternic chemoattractant pentru neutrofile. În celulele care exprimă leucotriena C4-sintază, precum mastocitele sau eozinofilele, leucotriena A_4 va fi conjugată cu tripeptidul glutathion pentru a forma prima cistenil-leucotrienă, leucotriena C_4 . În spațiul extracelular, leucotriena C_4 poate fi convertită succesiv în leucotrienele D_4 și E_4 . Odată sintetizate, leucotrienele C_4 , D_4 și E_4 vor promova contracția mușchilor netezi bronșici și vasculari, creșterea permeabilității vaselor mici, creșterea secreției de mucus la nivelul căilor aeriene și recrutarea leucocitelor la sediul inflamației. A fost postulată și existența leucotrienei G_4 , un metabolit al leucotrienei E_4 , în structura căreia grupul cistenil este oxidat la un α -cetoacid.

În calitate lor de mediatori în cadrul mecanismelor de transducție a semnalelor, leucotrienele își manifestă efectele biologice în special prin legarea la nivelul receptorilor cuplați cu proteinele G, fiind implicate într-o serie de mecanisme fiziopatologice responsabile de producerea astmului bronșic, reacțiilor alergice și inflamatorii.

După exercitarea efectelor biologice specifice, activitatea eicosanoizilor va fi sistată prin reducerea concentrației acestora bazată pe procese de difuziune, reconversie în fosfolipide sau degradare enzimatică. Leucotrienele B_4 , C_4 , D_4 și E_4 spre exemplu vor fi degradate parțial la nivel tisular, devenind ulterior metaboliți inactivi la nivelul ficatului.

18.3.6 FOSFORILAREA - O ETAPĂ COMUNĂ ÎN CADRUL MECANISMELOR DE TRANSDUCȚIE A SEMNALULUI DEPENDENTE DE MESAGERI SECUNZI

În marea lor majoritate, mecanismele de transducție a semnalului care au la bază activitatea unor mesageri secunzi se bazează pe fosforilarea reversibilă a diferitelor componente ale

sistemului. Acest proces de fosforilare joacă un rol important în fiecare etapă a mecanismului de transducție a semnalului:

- reglarea activității receptorilor prin autofosforilarea tirozin-kinazelor și desensibilizarea receptorilor cuplați cu proteinele G;
- reglarea activității kinazelor de către o serie de mesageri secunzi;
- influențarea activității substratului diferitelor kinaze, care poate fi el însuși o kinază.

Implicarea reacțiilor de fosforilare în toate aceste etape ale mecanismelor de transducție a semnalului asigură două caracteristici principale ale acestor mecanisme - *amplificarea și reglarea flexibilă*.

Legarea unei grupări fosfat de reziduurile serină, treonină sau tirozină ale proteinelor țintă amplifică semnalul inițial declanșat prin legarea ligandului de receptor prin crearea unei memorii moleculare legate de activarea acestui mecanism. Defosforilarea șterge această memorie, fiind un proces care necesită însă o perioadă mai lungă de timp decât cea necesară pentru disocierea legăturii alosterice.

Specificitatea diferită asupra substratului multiplelor protein-kinaze reglate de mesagerii secunzi oferă situsuri țintă care pot fi reglate în mod independent. Astfel, AMP_c, Ca²⁺ sau alți mesageri secunzi pot profita de prezența sau absența anumitor kinaze sau substraturi ale unor kinaze, producând efecte diferite în tipuri diferite de celule.

18.4 INTERACȚIUNEA MECANISMELOR DE TRANSDUCȚIE A SEMNALULUI

Nu este neobișnuit ca un singur ligand să determine activarea a multiple căi de transducție a semnalului și astfel să inducă efecte biologice diferite. Este ilustrativă în acest sens legarea catecolaminelor la receptorii β-adrenergici cuplați cu proteinele G_s și activarea consecutivă a mecanismelor AMP_c-dependente pe de o parte, dar și la receptorii α-adrenergici cuplați cu proteinele G_q și activarea consecutivă a mecanismelor GMP_c-dependente pe de altă parte.

Mai mult decât atât, legarea unui ligand la un singur tip de receptor poate determina uneori efecte biologice extrem de variate prin activarea în paralel a multiple sisteme de mesageri secunzi. Este cazul activării mecanismelor de transducție a semnalului AMP_c-dependente, a celor dependente de fosfoinozotide, dar și a celor mediate de mobilizarea Ca²⁺-ului de către liganzi precum hormonul luteinizant, hormonul eliberator al gonadotropinelor, și chiar catecolaminele prin acțiunea asupra receptorilor α-adrenergici. Acest mecanism poate fi explicat prin activarea subunităților α a proteinelor G stimulate sau dimpotrivă, a subunităților βγ ale acestor proteine, dar și prin existența unor proteine G cu subunități α diferite.

Capacitatea complexelor ligand-receptor de a activa multiple sisteme efectoare joacă un rol important în specificitatea de țesut a răspunsului la acești liganzi. Datorită acestui mecanism, diferiți hormoni pot exercita efecte diferite în diferite țesuturi ale organismului.

Existența a multiple interacțiuni între diferite căi de transducție a semnalului contribuie suplimentar la complexitatea acestor mecanisme. Astfel, căile de transducție a semnalului mediate de fosfoinozotide și respectiv AMP_c funcționează în opoziție una cu cealaltă la

nivelul unor celule și complementar la nivelul altor celule. În timp ce la nivelul mușchilor netezi eliberarea Ca^{2+} -ului IP_3 -mediată induce vasoconstricție, creșterea nivelurilor de AMPc are un puternic efect vasodilatator. Pe de altă parte, cele două sisteme, IP_3 -dependent și AMPc-dependent, au efecte sinergice în ceea ce privește eliberarea glucozei din ficat. Alte exemple de astfel de interacțiuni sunt modularea funcției receptorilor estrogenici de către factori de creștere precum factorul de creștere endotelial, factorul de creștere de tip insulinar-1 sau factorul de creștere și transformare- β , dar și stimularea transcripției receptorilor progesteronici și estrogenici de către dopamină.

Bibliografie

1. Ashcroft FM. Ion Channels and Disease. Academic Press: San Diego 2000; 199-210.
2. Barnard EA. Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. Trends Biochem Sci 1992; 17: 368-74.
3. Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, et al. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on basis of subunit structure and receptor function. Pharmacol Rev 1998; 50: 291-313.
4. Bauman AL, Scott JD: Kinase- and phosphatase-anchoring proteins: harnessing the dynamic duo. Nature Cell Biol 2002; 4: E203-6.
5. Baynes JW, Marek HD. Medical Biochemistry 2nd Edition. Elsevier Mosby 2005; 555.
6. Bertil H. Ion channels of excitable membranes (3rd edition) 2001; 41.
7. Birnbaumer L. Receptor-to-effector signaling through G proteins: Roles for beta gamma dimers as well as α subunits. Cell 1992; 71: 1069-72.
8. Bormann J, Faigenspan A. GABAC receptors. Trends Neurosci 1995; 18: 515-9.
9. Branco AF, Allen BG. G protein-coupled receptor signaling in cardiac nuclear membranes. J Cardiovasc Pharmacol 2015;65(2): 101-9.
10. Cairolì P, Pieraccini S, Sironi M, et al. Studies on human taste. Synthesis of new guanosine 5'-phosphate derivatives and their synergistic effect with monosodium glutamate. J Agric Food Chem 2008; 56(3): 1043-50.
11. Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, et al. High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. Science 2007; 318(5854): 1258-65.
12. Chin K, Yang W, Ravatn R. Reinventing the wheel of cyclic AMP: Novel mechanisms of cAMP signaling. Ann New York Acad Sci 2002; 968: 49-64.
13. Colquhoun D, Sivilotti LG. Function and structure in glycine receptors and some of their relatives. Trends Neurosci 2004; 27: 6337-44.
14. Corringer PJ, Le Noverè N, Changeux JP. Nicotinic receptors at the aminoacid level. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2000; 40: 431-58.
15. Curtis SW, Washburn T, Sewall C et al. Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: Estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 12626-30.

16. Daugan A, Grondin P, Ruault C, et al. The discovery of tadalafil: a novel and highly selective PDE5 inhibitor. *J Med Chem* 2003; 46(21): 4533-42.
17. de Caterina R, Basta G: n-3 Fatty acids and the inflammatory response – biological background. *Eur Heart J Suppl* 2001; 3: D42-9.
18. El-Tanani MKK, Green CD. Interaction between estradiol and growth factors in the regulation of specific gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 60: 269-76.
19. El-Tanani MKK, Green CD. Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 928-37.
20. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-95.
21. Ferris CD, Snyder SH. IP3 receptors. Ligand-activated calcium channels in multiple forms. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1992; 26: 95-107.
22. Finia GM, Sassone-Corsi P. Cyclic AMP signalling. *J Cell Sci* 2001; 114: 1971-2.
23. Fitzpatrick D, Purves D, Augustine G. *Neuroscience* (3rd ed). Sunderland, Mass: Sinauer 2004.
24. Francis SH, Corbin JD. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1999; 36(4): 275-328.
25. Funk Colin D. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* 2001; 294(5548): 1871-5.
26. Hevers W, Lüddens H. The diversity of GABAA receptors. *Mol Neurobiol* 1998; 18: 35-86.
27. Iffland A, Kohls D, Low S, et al. Structural determinants for inhibitor specificity and selectivity in PDE2A using the wheat germ in vitro translation system. *Biochemistry* 2005; 44(23): 8312-25.
28. Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC et al. Coupling of dual signaling pathways: Epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4658-62.
29. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
30. Johnson DA, Akamine P, Radzio-Andzelm E. Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* 2001; 101: 2243-70.
31. Jones AK, Sattelle DB. Functional genomics of the nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* 2004; 26: 39-49.
32. Kahn CR, Smith RJ, Chin WW. Mechanism of action of hormones that act at the cell surface. In Wilson JD, Foster DW (eds): *Williams Textbook of Endocrinology*. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders 1992; 91-134.
33. Kahn CR, Smith RJ, Chin WW. Mechanism of action of hormones that act at the cell surface. In Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (eds): *Williams Textbook of Endocrinology*. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders 1998; 95-143.
34. Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology* (4th Edition). A Lange Medical Book 1989; 14-22.
35. Kenakin T. *Pharmacological analysis of drug receptor interactions* 1993.
36. Klinge C, Rao C. The steroid hormone receptors. In *Glob Libr Women's Med* 2008. http://www.glowm.com/section_view/heading/The%20Steroid%20Hormone%20Receptors/item/280
37. Klinge C, Rao C. Cell membrane receptors. In *Glob Libr Women's Med* 2008. http://www.glowm.com/section_view/heading/Cell%20Membrane%20Receptors/item/281
38. Kolman R. *Color Atlas of Biochemistry*. Thieme 2005.

39. Le Noverè N, Changeux JP. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor subunit family: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* 1995; 40: 155-72.
40. Maehle AH. "Receptive substances": John Newport Langley (1852-1925) and his path to a receptor theory of drug action. *Med Hist* 2004; 48(2): 153-74.
41. Milligan G, Bond RA, Lee M. Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy? *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16(1): 10-3.
42. Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science* 2002; 296(5573): 1636-9.
43. Ortells MO, Lunt GG. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* 1995; 18: 121-6.
44. Parker K, Bruton L, Sanford GL, et al. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics (11th ed). New York: McGraw-Hill 2006; 185.
45. Power RF, Mani SK, Codina J, et al. Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* 1991; 254: 1636-9.
46. Rang HP. Pharmacology. Edinburgh: Churchill Livingstone 2003; 172-187.
47. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, et al. Crystal structure of the human β 2-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 2007; 450(7168): 383-7.
48. Raveh A, Turecek R, Bettler B. Mechanisms of fast desensitization of GABAB receptor-gated currents. *Adv Pharmacol* 2015; 73: 145-65.
49. Raven PH, Johnson GB, Losos JB, et al. Biology (7th edition) 2005; 134.
50. Robinson-White A, Stratakis CA. Protein kinase A signaling: "Cross-talk" with other pathways in endocrine cells. *Ann New York Acad Sci* 2002; 968: 256-70.
51. Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, et al. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β 2-adrenergic receptor function. *Science* 2007, 318(5854): 1266-73.
52. Rubenstein, Lester A, Lanzara RG. Activation of G protein-coupled receptors entails cysteine modulation of agonist binding. *J Mol Struc-Theochem* 1998; 430: 57-71.
53. Shabb JB. Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* 2001; 101: 2381-11.
54. Shami PJ, Moore JO, Cockerman JP, et al. Nitric oxide modulation of the growth and differentiation of freshly isolated acute non-lymphocytic leukaemia cells. *Leukaemia Research* 1995; 19(8): 527-34.
55. Smith CL. Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod* 1998; 58: 627-32.
56. Soberman RJ, Christmas P. The organization and consequences of eicosanoid signaling. *J Clin Invest* 2003; 111: 1107-13.
57. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994; 372(6503): 231-6.
58. Stephani A, Nuno JC, Heinrich R. Optimal stoichiometric designs of ATP-producing systems as determined by an evolutionary algorithm. *J Theor Biol* 1999; 199: 45-61.
59. Stockman A, Sharpe LT, Tufail A, et al. The effect of sildenafil citrate (Viagra) on visual sensitivity 2007; *J Vis*; 7(8): 4.
60. Strachan T, Read AP. Leptospira. In: Human Molecular Genetics (2nd ed.) Wiley-Liss 1999.
61. Stryer L. Biochemistry (4th Edition) 1995; 732.

62. Surks HK. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: A tale of two isoforms. *Circ Res* 2007; 101: 1078-80.
63. Szóllósi E, Bobok A, Kiss L, et al. Cell-based and virtual fragment screening for adrenergic α_2C receptor agonists. *Bioorg Med Chem* 2015. [Epub ahead of print].
64. Tan CM, Brady AE, Nickols HH, et al. Membrane trafficking of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 559-609.
65. Thompson EB. Single receptors, dual second messengers. Comment. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 501.
66. Walter F. Medical physiology: A cellular and molecular approach. Elsevier/Saunders 2005; 108.

19

Hormonii hipotalamo-hipofizari – aspecte biochimice și fiziopatologice

Didona Ungureanu

Hipotalamusul reprezintă o regiune a diencefalului, situată la baza creierului, sub talamus și deasupra hipofizei, de care este legat prin tija pituitară. El reprezintă „placa turnantă” dintre sistemul nervos și cel endocrin cu rol în reglarea sistemului endocrin, prin intermediul glandei hipofize. Hipotalamusul influențează eliberarea hormonilor adenohipofizari pe cale vasculară, prin sistemul port hipotalamo-hipofizar, iar pe cale nervoasă, prin tractul hipotalamo-hipofizar, eliberează hormonii neurohipofizari.

Hipofiza, glandă situată la baza creierului, într-o lojă osoasă numită șaua turcească, este alcătuită din două zone distincte embriologic, structural și funcțional. Lobul anterior (adenohipofiza) are origine endodermică și reprezintă 75% din greutatea glandei. Lobul posterior (neurohipofiza) are origine diencefalică.

Între nucleii mijlocii hipotalamici și adenohipofiză există legături vasculare reprezentate de sistemul port hipotalamo-hipofizar, descris de Gr. T. Popa și U. Fielding. Sistemul este format din vase portale și două plexuri capilare. Plexul superior este situat la nivelul hipotalamusului și comunică cu plexul inferior, de la nivelul hipofizei anterioare prin vase portale situate de-a lungul tije pituitare (figura 19.1)

19.1 HORMONII HIPOTALAMICI

Hormonii hipotalamici au structură chimică de peptide sau de amine. Unii hormoni hipotalamici controlează activitatea adenohipofizei, la nivelul căreia ajung prin sistemul port hipofizar. Aceștia se numesc hormoni hipofizotropi și se comportă fie ca activatori (liberine), fie ca inhibitori (inhibine). Un alt grup de hormoni hipotalamici, sunt denumiți hormoni neurohipofizari; ei ajung în neurohipofiză prin tractul hipotalamo-hipofizar.

19.1.1 HORMONII HIPOTALAMICI HIPOFIZOTROPI ACTIVATORI

1. **GH-RH** sau GRH (growth hormone releasing hormone, somatoliberina), un polipeptid format din 44 de aminoacizi, care stimulează eliberarea hormonului de creștere (GH – „growth hormone”). Este sintetizat sub forma unui precursor de 105 aminoacizi, care ulterior este clivat. GH-RH face parte dintr-o familie de peptide omologe care includ peptidul vasoactiv intestinal (VIP), secretina, glucagonul și altele. Ca și CRH, are un timp de înjumătățire relativ mare, de aproximativ 50 de minute.

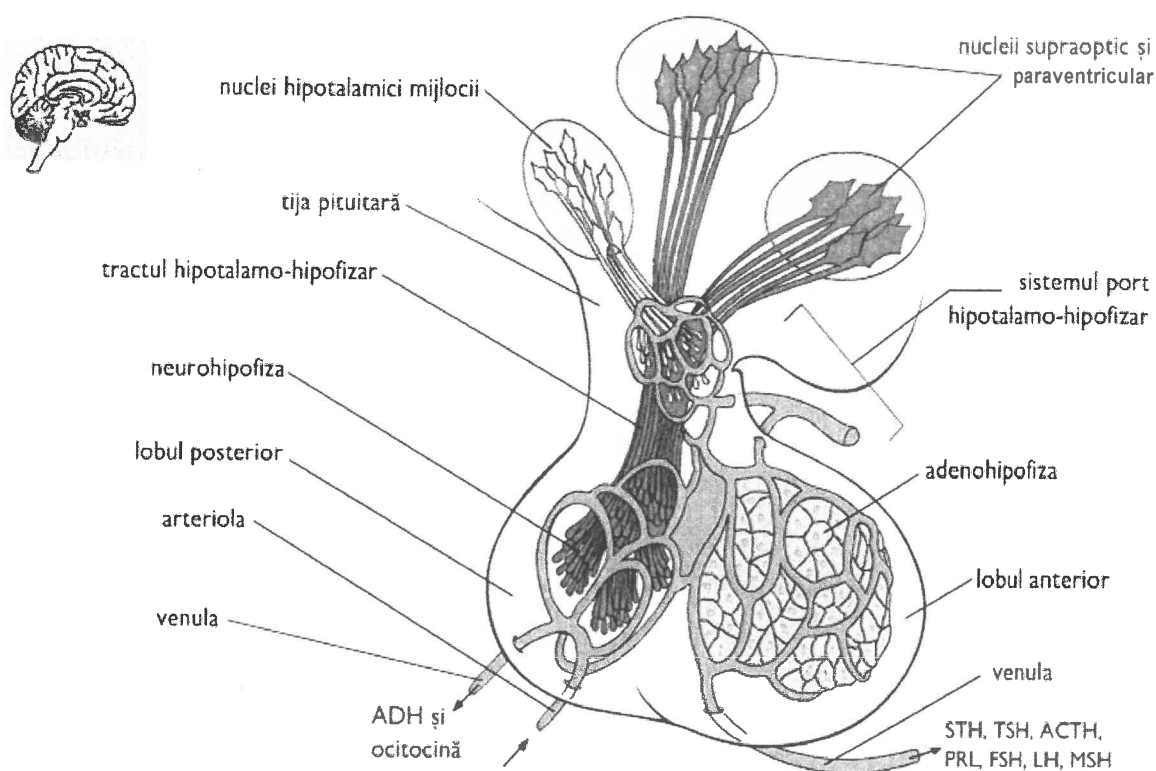


Figura 19.1 Sistemul hipotalamo-hipofizar

(<http://www.lefo.ro/aelbiologie.lefo.ro/biologie/USC>)

2. **CRH** (corticotropin release hormone, corticoliberina), un polipeptid cu 41 de aminoacizi, care stimulează eliberarea ACTH și secundar a β -lipotropinei (β -LPH) și a hormonului melano-citostimulator (MSH). CRH are un timp de înjumătățire lung (aproximativ 60 de minute), iar efectul său de stimulare a transcripției POMC (precursorul ACTH) este potențat și de ADH și angiotensina II. În contrast, ocitocina inhibă secreția de ACTH prin inhibarea CRH. CRH mai este secretat de către placenta (nivelul său plasmatic crește în timpul sarcinii și nașterii). S-a descris o proteină de legare a CRH - (CRH BP - "CRH binding protein") atât în ser cât și intracelular care se pare că intervine în modularea efectelor CRH.

3. **TRH** (thyrotropin releasing hormone, tiroliberina) este un tripeptid care stimulează eliberarea TSH din adenohipofiză. Secundar, are efect stimulator și asupra eliberării prolactinei și gonadotropinelor. Alți factori cu efect stimulator pe prolactină este VIP (secretat de hipotalamus), cât și terminațiile nervoase serotoninergice.

4. **GnRH** (LH-RH, FSH-RH, gonadotropin-releasing hormone, gonadoliberina) este un decapeptid care stimulează secreția hormonilor foliculostimulant (FSH) și luteinizant (LH). Este sintetizat ca pro-GnRH de 92 de aminoacizi care prin scindare parțială generează atât GnRH cât și un peptid cu 56 de aminoacizi cu acțiune inhibitorie asupra prolactinei.

19.1.2 HORMONII HIPOTALAMICI HIPOFIZOTROPI INHIBITORI

1. **GH-IH**, GHI (growth hormone inhibiting hormone, somatostatina), este un peptid cu 14 aminoacizi care inhibă eliberarea hormonului de creștere din adenohipofiză; secundar

inhibă și secreția de TSH (și după unii autori inhibă și FSH și ACTH). Somatostatina este sintetizată sub forma unui preprohormon de 116 aminoacizi atât în hipofiză cât și în alte țesuturi (celulele D ale insulelor Langerhans pancreatice, mucoasa gastrointestinală, celulele C parafoliculare tiroidiene). Procesarea zonei carboxiterminale a preprohormonului va determina sinteza somatostatinei cu 14 aminoacizi (somatostatina₁₄), iar procesarea zonei aminoterminale va determina sinteza somatostatinei cu 28 aminoacizi (somatostatina₂₈). Somatostatina₁₄ se sintetizează la nivel hipotalamic pe când somatostatina₂₈ la nivelul celorlalte țesuturi. Somatostatina are acțiune inhibitorie și pe alți hormoni incluzând insulina, glucagonul, gastrina, secretina, VIP.

2. **PIH**, PIF (prolactin inhibiting hormone, hormon inhibitor al eliberării prolactinei), reprezentat de dopamină. Dopamina inhibă sinteza prolactinei, inhibând transcripția genei ce o codifică. Dopamina inhibă și secreția de TSH. A fost descris și un alt neuropeptid, care are atât acțiune de eliberare a hormonilor gonadotropi, cât și de inhibare a prolactinei, peptid numit **GAP** (GnRH-associated peptide).

Secreția hormonilor hipotalamici este sub controlul hormonilor glandelor periferice, printr-un mecanism de feed-back. Astfel sinteza și eliberarea GH din adenohipofiză este sub controlul factorilor stimulatori și inhibitori hipotalamici. La rândul lor, factorii hipotalamici sunt controlați de către IGF-1 (somatomedina C), factorul de creștere responsabil de acțiunile GH. Astfel, IGF-1 stimulează eliberarea GH-IH și inhibă eliberarea GH-RH.

Eliberarea CRH din hipotalamus este influențată de cortizol (principalul glucocorticoid sintetizat de corticosuprarenală), o concentrație crescută a cortizolului determinând inhibiția eliberării CRH hipotalamic și în consecință secreția de ACTH din hipofiză nu mai este stimulată.

La fel, secreția de TRH influențează secreția de TSH, care va stimula secreția hormonilor tiroidieni. La rândul lor, hormonii tiroidieni vor regla secreția de TRH. Eliberarea de TSH este de asemenea, inhibată de GH-IH.

Secreția de GnRH influențează eliberarea FSH și LH care vor determina sinteza și secreția hormonilor sexuali. Nivelurile hormonilor sexuali vor regla secreția hipotalamică de GnRH.

Secreția de prolactină este influențată în principal de factorii inhibitori hipotalamici (dopamina, GAP). Secundar prolactina este stimulată de TRH, dar și pe cale nervoasă prin reflexe cu punct de plecare mamelonar.

Deși inițial s-a crezut că toți factorii hipotalamici acționează la nivelul celulelor țintă prin intermediul AMPc, ulterior s-a descoperit că GnRH și TRH au ca mesageri secundari diacilglicerolul (DAG) și inozitol trifosfatul (IP3).

19.2 HORMONII ADENOHIPOFIZARI

Adenohipofiza produce și secretă hormoni de natură polipeptidică care reglează dezvoltarea și funcțiile altor glande endocrine (hormoni tropi sau tropine) sau au rol în reglarea proceselor metabolice fundamentale din diverse țesuturi.

Studii recente asupra mecanismului de sinteză al hormonilor și de acțiune intracelulară, au permis clasificarea hormonilor adenohipofizari în 3 clase:

1. Grupul hormonilor somatomamotropi
2. Grupul hormonilor glicoproteici
3. Grupul hormonilor care derivați din POMC (proopiomelanocortina)

19.2.1 GRUPUL HORMONILOR SOMATOMAMOTROPI

Din acest grup fac parte hormonul de creștere (GH, somatotropina) și prolactina (PRL, hormonul lactogen). Alături de acești doi hormoni adenohipofizari, în această clasă intră, pe baza omologiei structurale și un hormon elaborat de placenta – somatomamotropina corionică (CS, hormon lactogen placentar).

Acești hormoni polipeptidici cuprind 191 de resturi de aminoacizi (GH și CS) și respectiv 199 (PRL). Între GH și CS există o omologie structurală de 85%, pe când omologia între PRL și GH este de aproximativ 35%. Din această cauză toți cei trei hormoni prezintă activități comune: de stimulare atât a creșterii celulare cât și a secreției lactate.

19.2.1.1 Hormonul de creștere (GH, growth hormone, somatotropina)

Hormonul de creștere uman este un hormon polipeptidic, alcătuit din 191 aminoacizi, care controlează creșterea postnatală, în mod indirect, acționând asupra ficatului, unde stimulează producerea IGF-1 (insulin-like growth factor -1, somatomedina C), care stimulează încorporarea sulfatului în cartilaje. Hormonul de creștere are și acțiuni reglatorii asupra metabolismelor glucidic, lipidic, proteic și mineral, care nu sunt mediate de IGF-1. El stimulează sinteza proteinelor prin facilitarea transportului aminoacizilor în celulele musculare, având efecte similare insulinei. Asupra metabolismului glucidic, hormonul de creștere are acțiuni antagoniste insulinei, diminuând catabolismul tisular al glucozei și stimulând gluconeogeneza, cu efect hiperglicemiant. În cadrul metabolismului lipidic hormonul de creștere stimulează lipoliza, cu mobilizarea acizilor grași din depozite, care ulterior vor fi oxidați în ficat (acțiune cetogenică). Prin mobilizarea și utilizarea acizilor grași ca sursă energetică, GH se opune utilizării aminoacizilor ca material energetic, aceștia fiind direcționați către sinteza de proteine. În cadrul metabolismului mineral hormonul de creștere stimulează retenția de calciu, magneziu și fosfor în principal și secundar de sodiu, potasiu și clor. Balanțele pozitive ale calciului, magneziului și fosforului reprezintă efecte mediate de IGF-1, fiind legate de creșterea epifizală a oaselor lungi la copii.

Secreția hormonului de creștere este controlată de către hipotalamus, prin doi hormoni: GH-RH și GH-IH (somatostatina). Hormonul de creștere circulant își inhibă propria secreție prin stimularea eliberării din hipotalamus a GH-IH. IGF-1 are de asemenea, acțiune inhibitoare asupra secreției hormonului de creștere, prin inhibarea secreției de GH-RH și stimularea secreției de GH-IH. Alți factori care reglează secreția hormonului de creștere sunt prezentați în tabelul 19.1.

Hiposecreția de GH, la copil, determină nanismul hipofizar, caracterizat prin insuficiență staturo-ponderală, dar proporțiile dintre segmentele corpului sunt păstrate ("nanism armonnic"). În etiologia nanismului hipofizar se descriu defecte genetice (mutații sau deleții ale

Tabel 19.I Factorii care modulează secreția de GH

Factori	Stimulatori	Inhibitori
Neurali	Somnul Stres (emoții, traumatisme, infecții) Agoniști alfa-adrenergici și antagoniști beta-adrenergici Agoniști dopaminergici Agoniști serotoninergici	Absența emoțiilor Agoniști beta-adrenergici Antagoniști alfa-adrenergici Antagoniști dopaminergici
Metabolici	Hipoglicemie Aminoacizi plasmatici (în special arginina) Uree crescută Scăderea acizilor grași liberi	Hiperglicemie Nivel crescut de acizi grași în sânge Obezitate
Hormonali	GH-RH Nivel scăzut de IGF-1 Estrogeni Glucagon Vasopresină	GH-IH (somatostatina) Hipotiroidism

genei pentru GH sau ale genei care codifică receptorul pentru GH), anomalii sau leziuni ale celulelor secretante de GH. În 50-80% din cazuri, nanismul este idiopatic.

Paraclinic dozarea doar a GH nu este recomandată deoarece valorile normale ale acestui hormon sunt foarte mici (între 1ng/ml - 5 ng/ml). Testele dinamice s-au dovedit mult mai eficiente. Astfel cel mai eficient stimul de secreție a GH este hipoglicemia ($\leq 40\text{mg/dl}$) indusă de insulină, care determină la subiecții normali o creștere a GH peste 10ng/ml la 20 - 25 de minute după administrarea insulinei. Testul trebuie efectuat în spital sub strictă supraveghere medicală. Testul la administrarea de GH-RH și de arginină este util în evaluarea secreției de GH. Administrarea de GH-RH (1 $\mu\text{g/kg}$) combinată cu o infuzie de 30 de minute de arginină (0,5g/kg dar maxim 20 de grame) determină rapid o creștere a concentrației GH la valori de 10-15ng/ml în 30 de minute după perfuzie, la subiecții sănătoși.

Hipersecreția de GH (cel mai frecvent datorită unei tumori hipofizare cu celule acidofile), înaintea închiderii cartilajelor epifizale de creștere determină gigantism iar la adulți, acromegalia. Gigantismul se caracterizează prin creștere exagerată în înălțime depășind cu 20% media vârstei și sexului. Modificările metabolice sunt asemănătoare subiecților acromegali.

Acromegalia apare la adulți secundar hipersecreției de GH și din punct de vedere clinic se caracterizează prin dismorfie progresivă. În etiopatogenia acromegaliei se descriu disfuncții hipotalamo-hipofizare (tulburare primitiv hipofizară sau tulburare hipotalamică cu scăderea somatostatinei și creșterea GH-RH care duce la adenom hipofizar) sau mai rar secreții ectopice de GH (tumori pulmonare, ale insulelor pancreatice) sau de GH-RH (carcinom mamar, endometrial, pancreatic).

Dismorfismul cuprinde scheletul, țesuturile moi și viscerele. La nivelul scheletului se constată creșterea oaselor feței, cu frunte îngustă, arcade sprâncenare și zigomatice proemi-

nente, nas și buze groase, macroglosie, cu aspect "geografic" al limbii și amprente dentare. La nivelul extremităților se constată lățirea mâinilor și picioarelor, iar la nivelul viscerelor – visceromegalie. Paraclinic se constată o curbă de tip diabetic la testul de toleranță la glucoza orală, calcemie normală cu calciurie crescută, fosfatemie normală, fosfataza alcalină serică este crescută, acizii grași liberi din ser sunt crescuți. Dozarea GH relevă o valoare crescută peste 5 ng/ml, cu anularea ritmului nictemeral de secreție al GH. De menționat că o singură dozare a GH ar putea da un răspuns fals negativ deoarece în acromegalie secreția GH este episodică și trebuie ținut cont de faptul că și alți factori pot influența secreția de GH. Ca test dinamic se folosește testul de supresie cu glucoză, care este cel mai simplu test și specific pentru acromegalie. La subiecții sănătoși administrarea a 100 de grame de glucoză va determina scăderea GH sub 1 ng/ml la 60 de minute după administrare. În acromegalie, GH poate scădea (dar niciodată sub 1 ng/ml), crește sau rămâne neschimbat și această lipsă de răspuns stabilește diagnosticul. Prolactina este normală sau crescută, somatomedinele (IGH) sunt crescute. Dozarea IGH este utilă în stabilirea diagnosticului de acromegalie deoarece nivelul IGH reflectă secreția de GH. IGF având un timp de înjumătățire mai lung decât GH, nu prezintă fluctuații și de aceea valori crescute ale IGF se întâlnesc la toți pacienții cu acromegalie. Hidroxiprolina urinară și alți markeri de turnover osos sunt crescuți în perioada evolutivă.

19.2.1.2 Prolactina

Prolactina este un hormon polipeptidic, a cărui acțiune fiziologică principală este de a iniția și menține lactația postpartum. În timpul sarcinii, PRL împreună cu alți hormoni (estrogeni, progesteron, CS, insulină, cortizol) stimulează dezvoltarea glandei mamare și pregătirea acesteia pentru lactație. Deși în timpul sarcinii PRL are un rol major în creșterea și dezvoltarea glandei mamare, totuși, în afara sarcinii PRL nu acționează ca factor de creștere asupra acestei glande. În timpul sarcinii estrogenii stimulează dezvoltarea glandei mamare, dar blochează acțiunea lactogenă a PRL. Scăderea atât a estrogenilor cât și a progesteronului după naștere va permite prolactinei să-și exercite rolul său lactogen. Secreția crește în timpul sarcinii, iar la femeile care nu alăptează revine la normal la aproximativ șapte zile după naștere. La femeile care alăptează, concentrația prolactinei începe să descrească după primele trei luni de la naștere, chiar dacă alăptatul continuă.

Deși PRL nu are rol major asupra aparatului genital feminin, totuși hiperprolactinemia se însoțește de hipogonadism. Astfel la femeile cu hiperprolactinemie se constată inițial o scurtare a fazei luteale, urmată de anovulație, hipomenoree sau amenoree și infertilitate. La bărbați excesul de prolactină se sociaza cu scăderea sintezei de testosteron, scăderea spermatogenezei, clinic constatându-se scăderea libidoului, impotență și infertilitate. Mecanismul exact prin care PRL influențează negativ funcția gonadelor nu este pe deplin cunoscut, dar se pare că are loc inhibarea axului hipotalamic – hipofizar. Sub acțiunea PRL nivelurile bazale ale LH și FSH sunt normale, dar eliberea lor pulsatilă este inhibată, iar "peak"-ul preovulator al LH este de asemenea, scăzut. Rezervele de gonadotropine ale hipofizei sunt normale (la testul de stimulare cu GnRH, răspunsul e normal).

PRL are și rol imunomodulator. PRL poate fi sintetizată și de limfocitele T, iar receptori pentru PRL s-au găsit atât pe suprafața limfocitelor T, B cât și a macrofagelor, având rol în stimularea proliferării anumitor seturi de limfocite.

La nivel hipotalamic prolactina inhibă secreția de GnRH, inhibând astfel secreția hormonilor gonadotropi hipofizari, iar la nivelul gonadelor blochează acțiunea acestor hormoni. Secreția prolactinei are caracter pulsatil, crecând în timpul somnului și în perioadele de stres, iar la femei este dependentă de concentrația estrogenilor.

Reglarea sintezei și secreției de prolactină este controlată în primul rând de factorii inhibitori hipotalamici. Dopamina inhibă atât sinteza (prin inhibarea transcripției genei pentru prolactină) cât și eliberarea prolactinei, dar nu este responsabilă de inhibiția totală a prolactinei. Agoniștii dopaminergici (de exemplu bromcriptina) se administrează în adenoame hipersecretante de prolactină.

TRH este un factor stimulator al PRL, iar în hipotiroidismul primar (de cauză tiroidiană) se constată un răspuns exagerat atât al TSH cât și a PRL, pe când în hipertiroidism valorile ambilor hormoni sunt scăzute. PRL mai este stimulată de VIP și agoniștii serotoninergici. Glucocorticoizii cât și administrarea de hormoni tiroidieni, tind să suprimă acțiunea stimulatoră a TRH asupra secreției de PRL.

Secreția de PRL este episodică observându-se o creștere a nivelului său seric la 60-90 de minute de la începutul somnului și nu depinde de momentul în care are loc somnul (diurn sau nocturn). Valorile maxime ale PRL s-au înregistrat între 4 și 7 dimineața.

Stresul (chirurgical, hipoglicemic, infarctul miocardic acut) determină creșteri ale secreției de PRL. Stimularea mamelonului la femeia gravidă, este urmată de asemenea, de descărcări de PRL.

Principalii factori care influențează secreția de PRL sunt enumerați în tabelul 19.II.

Prolactina se sintetizează cu o rată de aproximativ 400 μg/ml și are o durată de viață de aproximativ 50 de minute. Secreția de prolactină este afectată foarte rar în condițiile unor leziuni hipofizare și de aceea scăderea valorii sale serice sugerează hiposecreția de prolactină.

Hipersecreția de prolactină – prolactinoamele – sunt cele mai frecvente tumori ale hipofizei și o creștere a prolactinei serice în prezența unei disfuncții gonadale (hipomenoree, amenoree, anovulație, infertilitate la femei și scăderea libidoului, hipogonadism la bărbați) însoțită sau nu de galactoree, sugerează prezența tumorii.

19.2.2 GRUPUL HORMONILOR GLICOPROTEICI

Din acest grup fac parte tirotropina (TSH, "thyroid-stimulating hormone"), hormonul luteinizant (LH, "luteinizing hormone"), hormonul foliculostimulant (FSH, "folicle-stimulating hormone"), la care, din cauza omologiei structurale se adaugă și un hormon placentar – gonadotropina placentară (hCG, "chorionic gonadotropin").

Din punct de vedere structural hormonii din această grupă sunt alcătuiți din 2 lanțuri polipeptidice α și β legate necovalent, deci sunt heterodimeri $\alpha\beta$. Subunitatea α este identică la toți cei 4 hormoni (trei hipofizari și unul placentar) și are 96 de resturi de aminoacizi.

Tabelul 19.II Factorii care influențează secreția PRL

Factori stimulatori	Factori inhibitori
Fiziologici	
Sarcina	
Alăptarea	
Stimularea mamelonului	
Exercițiile fizice	
Stressul	
Somnul	
Neonatal	
Farmacologici	
TRH	Agoniști dopaminergici
Estrogeni	GABA
Peptidul vasoactiv intestinal (VIP)	
Antagoniști dopaminergici	
Inhibitori de monoaminoxidază	
Cimetidina	
Verapamil	
Patologici	
Tumori hipofizare	Pseudohipoparatiroidismul
Leziuni ale tijeii pituitare	Distrucții sau ablația hipofizei
Iradierea cerebrală	Hipofizita limfocitară
Leziuni ale peretelui toracic	
Leziuni ale măduvei spinării	
Hipotiroidismul	
Insuficiența renală cronică	
Insuficiența hepatică severă	

Astfel funcția biologică este dată de subunitatea β , dar hormonul este activ doar sub formă de heterodimer (subunitatea β singură nu poate activa receptorul). Subunitatea β are 115 aminoacizi la LH și FSH și 110 la TSH și hCG. Fiecare subunitate este sintetizată de gene diferite. Fiecare hormon glicoproteic prezintă pe subunitatea α două resturi glicozidice, iar pe subunitatea β există unul sau două resturi glicozidice. Resturile glicozidice ar fi importante în interacțiunea α - β .

Toți hormonii sunt sintetizați sub formă inactivă de prohormon și ulterior suferă modificări posttranslaționale în urma cărora rezultă hormonul activ.

Deși au structură asemănătoare, funcțiile acestor hormoni sunt diferite. La nivelul celulelor țintă acționează asupra unor receptori membranari cuplați cu proteina Gs. Deci mesagerul secund al acestor hormoni este AMPc.

19.2.2.1 Tirotropina (TSH, thyroid-stimulating hormone)

TSH este un hormon glicoproteic care se leagă la receptorii specifici situați pe celulele tiroidiene și stimulează sinteza și secreția hormonilor tiroidieni. TSH intervine în toate fazele biosintezei hormonilor tiroidieni, stimulând atât captarea și organificarea iodului, cât și hidroliza tiroglobinei, cu eliberarea hormonilor tiroidieni. Secreția de TSH este stimulată

de peptidul hipotalamic TRH și este inhibată de concentrațiile sanguine mari de hormoni tiroidieni. Somatostatina (GH-IH) acționează sinergic cu hormonii tiroidieni și blochează sinteza și eliberarea de TSH. Este hormonul care împiedică creșterea exagerată a TSH în hipotiroidismul primar (de cauză tiroidiană).

În afară de hipotalamus și alți factori influențează secreția de TSH. Dopamina inhibă secreția de TSH atât la persoanele sănătoase cât și la cele cu hipotiroidism primar, blocând, de asemenea secreția de TSH după administrarea de TRH. Astfel agoniștii dopaminergici inhibă secreția de TSH, iar antagoniștii dopaminergici au efecte inverse.

Excesul de glucocorticoizi scade sensibilizarea hipofizei la acțiunea TRH (determină scăderea expresiei numărului de receptori pentru TRH de pe suprafața celulei hipofizare).

Dimpotivă, estrogenii cresc sensibilitatea hipofizei la acțiunea TRH, astfel încât la femei secreția de TRH este urmată de descărcarea unei cantități superioare de TSH față de bărbați. Factorii fizici (frigul) și psihici (emoțiile) declanșează secreția de TSH, iar expunerea la cald o reduce.

Evaluarea secreției de TSH presupune dozarea atât a TSH cât și a fracției libere a tiroxinei (freeT_4 , fT_4). În condițiile în care cei doi hormoni sunt în limite normale, nu este necesară efectuarea de teste suplimentare. Hipotiroidismul primar de cauză tiroidiană se caracterizează prin creșterea secreției de TSH, cu scăderea fT_4 . Rareori, când se suspectează o hipotiroidie și fT_4 este normal, se indică dozarea de fT_3 (fracția liberă a triiodotironinei). Valori scăzute ale TSH, cu valori scăzute sau normale ale fT_4 sugerează un hipotiroidism secundar (de cauză hipofizară).

În hipertiroidism valorile TSH sunt scăzute (secundar feedback-ului negativ exercitat de hormonii tiroidieni), cu valori crescute ale fT_4 . Există și boli tiroidiene de cauză autoimună, care determină fluctuații ale TSH (sunt descrise în capitolul 20).

19.2.2.2 Gonadotropinele (FSH și LH)

FSH și LH sunt hormoni responsabili de funcțiile gonadelor (gametogenza și steroidogeneza) și sunt secretați de celulele gonadotrope hipofizare (care reprezintă 5 - 9 % din totalul celulelor adenohipofizei). Gonadotropinele sunt stimulate de GnRH hipotalamic.

FSH la femei acționează asupra celulelor granuloase foliculare și la bărbați asupra celulelor Sertoli testiculare, prin intermediul unui receptor cuplat cu adenilat ciclaza, deci mesagerul secund al acestui hormon este AMPc.

La femei FSH acționează în faza proliferativă (foliculară) a ciclului menstrual, asupra unui folicul primordial stimulând maturarea acestuia. Simultan stimulează sinteza și eliberarea de estradiol de către celulele foliculului în maturare. Estradiolul atinge nivelul maxim cu aproximativ 24 de ore înaintea ovulației și sensibilizează hipofiza la acțiunea GnRH (crește expresia numărului de receptori pentru GnRH de la nivelul celulelor gonadotrope hipofizare). În momentul ovulației există o secreție maximă de FSH și LH (a se vedea și capitolul 21, figura 21.1). Preovulator, FSH acționează asupra ovarului "pregătindu-l" pentru acțiunea LH (crește expresia numărului de receptori pentru LH la nivelul ovarului), care va determina ruperea foliculului și în consecință ovulația.

Administrarea continuă de doze mari de estrogeni – doze farmacologice - (ca de exemplu contraceptivele orale) va determina scăderea eliberării de FSH și LH din adenohipofiză prin acțiune atât directă cât și prin inhibiția eliberării GnRH de către hipotalamus.

Reglarea se face de către GnRH cu rol stimulator asupra FSH, feedback-ul negativ este asigurat de estrogeni și inhibină (peptid secretat de celulele granuloase foliculare).

La bărbat, FSH stimulează expresia receptorilor pentru LH de pe suprafața celulelor Leydig. La nivelul celulelor Sertoli stimulează sinteza unei glicoproteine transportoare pentru androgeni - ABP ("androgen binding protein"). ABP este diferită de proteina plasmatică de transport a hormonilor sexuali – SHBG ("sex-hormon binding globulin"). Testosteronul secretat în spațiul interstițial testicular este fixat de ABP și este transportat către lumenul tubilor seminiferi, locul spermatogenezei. Feedback-ul negativ este asigurat de inhibină (peptid produs de celulele Sertoli) (a se vedea și capitolul 21, figura 21.2).

LH prezintă un bioritm lunar la femei și o secreție pulsatilă la ambele sexe.

La femei, în faza foliculară inițială, creșterea constantă a estrogenilor va determina scăderea sintezei și producției de LH. Ulterior, pe măsură ce concentrația estrogenilor crește și atinge nivelul maxim preovulator, se declanșează, prin feedback pozitiv, o creștere a LH ("peak ovulator" cu 16 -18 ore înaintea ovulației). Această creștere bruscă (și maximală) a LH este responsabilă de ruperea foliculului ovarian și formarea corpului galben, care sub influența LH va produce progesteron, dar și cantități mici de estrogeni.

Progesteronul este principalul hormon al fazei luteale (secretorii) a ciclului menstrual și determină încărcarea cu glicogen și cu alte substanțe nutritive a endometriului în vederea asigurării nutriției unei eventuale celule-ou apărute și implantate. Dacă are loc fecundarea și implantarea celulei-ou, funcția LH este preluată de hCG placentar. hCG este responsabil de stimularea în continuare a corpului galben să producă progesteron până când placenta devine matură și este aptă să producă progesteronul. În absența fecundării ovulului, în a 24-a zi a ciclului menstrual, concentrațiile descrescătoare ale estrogenilor și progesteronului determină scăderea sintezei de LH, regresia corpului galben și apariția ulterioară a menstruației.

Înainte de instalarea pubertății concentrațiile de FSH și LH sunt foarte scăzute și nu răspund la administrarea de GnRH exogen. Prepubertar secreția FSH crește înaintea celei de LH.

La bărbați LH stimulează celulele Leydig prin fixare pe un receptor cuplat cu adenilat ciclaza care va determina creșterea concentrației intracelulare a AMPc. Efectul final este de stimulare a secreției de testosteron. Reglarea se face prin testosteron care inhibă la nivel hipotalamic eliberarea GnRH.

Evaluarea secreției de FSH și LH se face în paralel cu hormonii gonadali- estradiolul la femei și testosteronul la bărbați. La femei, prezența ciclului menstrual regulat reprezintă un argument puternic în favoarea unei funcționalități normale a axului hipotalamo – hipofizar. Nivelurile de estradiol sunt foarte rare sub valori de 50pg/ml, chiar și în primele zile ale fazei foliculare. Depistarea unei valori a estradiolului mai mică de 30pg/ml, în prezența oligomenoreei sau amenoreei, reprezintă un argument pentru diagnosticul de hipogonadism

ovarian. La bărbați valorile testosteronului total variază între 100 și 300ng/ml și reprezintă un parametru important al funcției testiculare. În prezența unui hipogonadism primar (de cauză ovariană sau testiculară) valorile LH și FSH sunt crescute. Valori normale sau scăzute ale LH și FSH sugerează un hipogonadism secundar (de cauză hipofizară) sau terțiar (de cauză hipotalamică). Ca test dinamic de evaluare a secreției de gonadotropine se poate utiliza testul cu un analog sintetic de GH-RH. Administrarea acestui analog de GH-RH va determina la persoanele sănătoase o creștere bruscă a LH și în mai mică măsură a FSH. Un alt test dinamic de evaluare a axului hipotalamo-hipofizaro-gonadal este testul la clomifen. Clomifenul este un inhibitor selectiv al receptorilor pentru estrogeni de la nivel hipotalamic. Astfel axul hipotalamo-hipofizaro-gonadal nu mai este sub influența feedback-ului negativ exercitat de estrogeni și în consecință, valorile serice ale gonadotropinelor (LH și mai puțin de FSH) vor crește după administrarea timp de 5 zile a clomifenului la femei premenopauzale, începând din a cincea zi a ciclului menstrual sau după o administrare de 7-10 zile la bărbați. În practica curentă clomifenul se utilizează la femei pentru inducerea ovulației, iar la bărbați pentru inhibarea efectelor nedorite ale estrogenilor (de exemplu în tratamentul ginecomastiei).

Adenoamele hipofizare secretante de hormoni glicoproteici (TSH, FSH, LH) sunt extrem de rare. Mai frecvente sunt adenoamele hipofizare nonsecretante care nu secretă hormoni activi, dar unele dintre aceste tumori secretă subunități alfa ale hormonilor glicoproteici.

19.2.3 GRUPUL HORMONILOR DERIVAȚI DIN PROOPIOMELANOCORTINA (POMC)

Proopiomelanocortina este alcătuită dintr-un singur lanț polipeptidic mare, de aproximativ 285 de aminoacizi și este produsă în diverse celule: adenohipofizare, ale lobului intermediar hipofizar (la speciile de animale care au acest lob), ale hipotalamusului, cortexului. Prin prelucrarea POMC se obțin mai multe fragmente cu rol hormonal (ACTH, LPH – hormon lipotrop, MSH – hormon melanocitostimulator), de neurotransmițător sau neuromodulator (endorfinele).

Prelucrarea POMC (figura 19.2) poate genera cel puțin 8 peptide, dar nu toate peptidele sunt generate în aceeași celulă. Sinteza acestor peptide diferă de la o celulă la alta și este dependentă de prezența proteazelor necesare scindării lanțului polipeptidic și de factorii reglatori metabolici sau endocrini care influențează activitatea acestor proteaze. Astfel în celulele corticotrope ale adenohipofizei, prin prelucrarea POMC rezultă trei fragmente: fragmentul N-terminal, ACTH și β -LPH. La speciile cu lob intermediar dezvoltat, prelucrarea POMC determină sinteza de γ MSH din fragmentul N-terminal, α -MSH și CLIP („corticotropin-like intermediary peptide”) prin scindarea ACTH și γ LPH și β -endorfină din β -LPH. Beta-endorfina sintetizată în adenohipofiză este rapid inactivată prin acetilare. Beta-endorfina sintetizată în hipotalamus sau în alte regiuni ale cortexului nu mai este acetilată și în consecință rămâne activă.

19.2.3.1 ACTH (corticotropina, adrenocorticotrophic hormone)

ACTH este un polipeptid alcătuit din 39 de aminoacizi, cu rolul de a controla creșterea și funcția corticosuprarenalelor. Funcțiile biologice sunt dependente de primii 24 de aminoacizi,

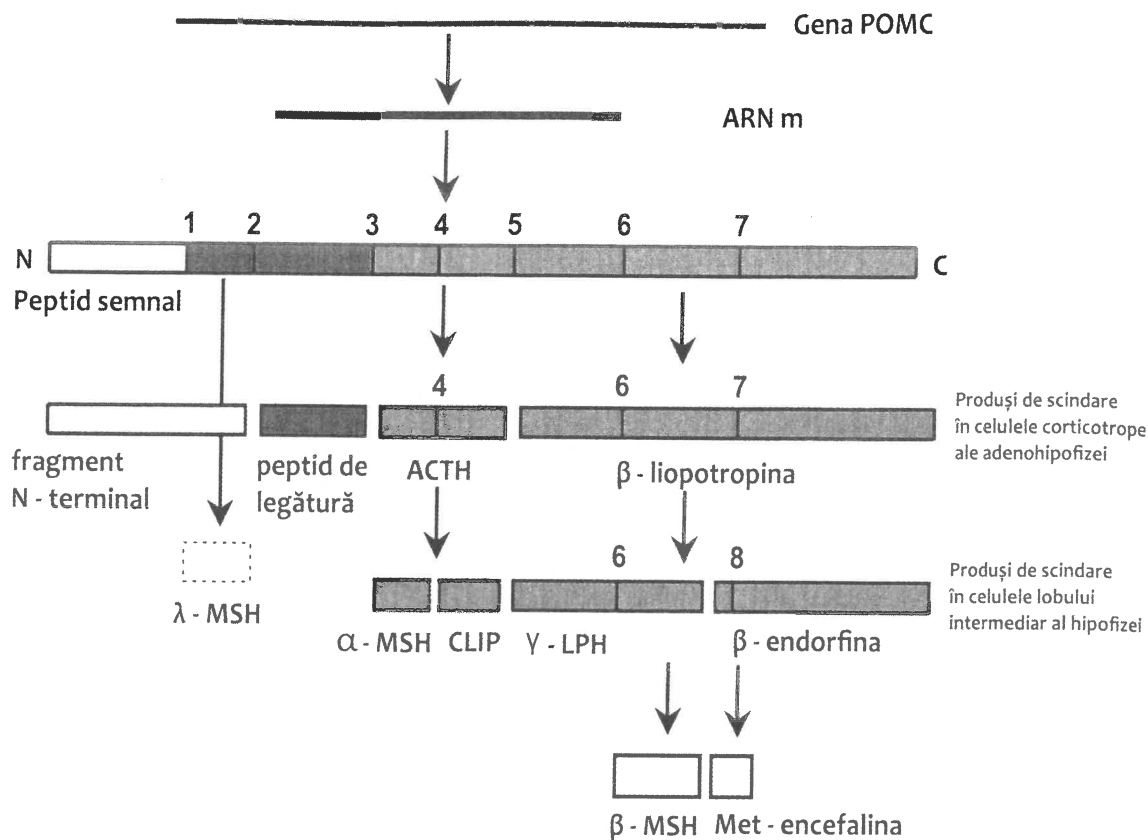


Figura 19.2 Sinteza și scindarea proopiomelanocortinei în diverse țesuturi.

aceștia fiind conservați la specii diferite. Analogi sintetici ai $ACTH_{1-24}$ sunt utilizați în terapie. ACTH activează prima etapă în sinteza hormonilor steroizi în corticosuprarenale, cea de transformare a colesterolului în pregnenolonă. Având în vedere că pregnenolona este precursorul nu doar al hormonilor glucocorticoizi ci și al mineralocorticoizilor și dehidroepiandrosteronului, o acțiune excesivă și prelungită a ACTH ar duce, teoretic, la stimularea tuturor celor trei clase de hormoni. În condiții fiziologice însă ACTH stimulează sinteza și eliberarea de glucocorticoizi, având influență minimă asupra celorlalte două clase de hormoni.

ACTH are și o slabă acțiune pigmentogenă asemănătoare MSH. Acțiunea se datorează omologiei structurale între ACTH și MSH (fragmentul de $ACTH_{1-13}$ este identic cu MSH), iar receptorul de MSH din piele va lega ACTH (α MSH și γ MSH nu există la oameni). Clinic s-a observat că în boala Addison apare o hiperpigmentare tegumentară secundară hipersecreției de ACTH.

β LPH este sintetizat și eliberat de adenohipofiză în concentrații echimoleculare cu ACTH dar funcția sa nu este pe deplin cunoscută. Are timp de înjumătățire mai lung decât al ACTH și de aceea s-a propus dozarea acestui peptid pentru evaluarea secreției hipofizare de ACTH.

Sinteza și secreția de ACTH sunt reglate de hormonul hipotalamic CRH, iar creșterea concentrației cortizolului inhibă secreția de CRH și ACTH. Secreția ACTH are un ritm circadian, cu maxim matinal și minim la miezul nopții.

ACTH acționează asupra celulelor țintă prin intermediul receptorilor membranari cuplați cu proteine Gs și având AMPc drept mesager secund. Se pare că unele acțiuni ale ACTH ar fi mediate și de ionul de calciu.

Deficiența de ACTH (hiposecreția corticosuprarenalei – CRS- secundară, de origine hipofizară) se caracterizează prin scăderea secreției de cortizol și de hormoni sexuali secretați de CSR. Nivelul de aldosteron nu se modifică deoarece principalul reglator al acestui hormon este sistemul renină – angiotensină. Măsurătorile bazale ale ACTH nu sunt foarte utile în depistarea anomaliilor de secreție ale acestui hormon de către hipofiză deoarece ACTH are un timp de înjumătățire foarte scurt și prezintă, de asemenea și fluctuații mari în cursul unei zile. Cortizolul seric trebuie dozat dimineața la ora 8, când valorile sale serice trebuie să se încadreze între 3 și 20 $\mu\text{g/dl}$, cu o medie între 10 și 20 $\mu\text{g/dl}$, iar valori normale ale cortizolemiei se pot întâlni atât la subiecți sănătoși cât și în hiposecreția CSR. Astfel depistarea unei cortizol seric de 5 $\mu\text{g/ml}$ sau mai scăzut, dozat la 8 a.m. reprezintă un argument puternic în favoarea unei hiposecreții CSR. Invers, un cortizol seric de 20 $\mu\text{g/ml}$ dozat la 8 a.m. exclude practic un deficit de secreție al acestui hormon. De aceea pentru evaluarea secreției de ACTH, se preferă testele dinamice, de stimulare a secreției de cortizol. Cel mai utilizat test dinamic este administrarea unui analog sintetic de ACTH. La subiecții normali, administrarea injectabilă a acestui analog sintetic de ACTH va determina, la 30 de minute, o cortizolemie de cel puțin 18-20 $\mu\text{g/ml}$ și acest răspuns se corelează cu răspunsul obținut la testul de hipoglicemie indus de insulină. Depistarea unor valori mai scăzute ale cortizolului seric în urma efectuării acestui test, sugerează o insuficiență CSR.

Evaluarea rezervelor de ACTH ale adenohipofizei se realizează prin inducerea unei hipoglicemii în urma administrării de insulină sau prin testele de stimulare cu Metirapone sau CRH. Testul la hipoglicemie se bazează pe faptul că valori ale glicemiei $\leq 40\text{mg/dl}$ reprezintă un stres major pentru axul hipotalamo-hipofizar-CSR și în consecință, valorile cortizolului ajung la peste 18-20 $\mu\text{g/dl}$. Deși și valorile ACTH cresc, totuși, datorită fluctuațiilor mari de secreție ale acestui peptid, dozarea și a ACTH în paralel cu cortizolul nu și-a găsit încă utilitatea. Testul trebuie efectuat doar în spital, sub strictă urmărire medicală și este contraindicat la persoanele cardiace și la vârstnici. Administrarea metiraponei este o alternativă la testul hipoglicemiei. Metirapona inhibă 11 β -hidroxilaza, (ultima enzimă de pe calea de sinteză a cortizolului) și în consecință sinteza și secreția cortizolului vor diminua. Astfel cortizolul nu-și va mai putea exercita influența inhibitorie asupra axului hipotalamo-hipofizar și în consecință, secreția de ACTH va crește. ACTH va stimula sinteza de cortizol în amonte de 11 β -hidroxilaza, cu sinteza excesivă a substratului acestei enzime – 11-dezoxicortizolul. Testul se realizează noaptea, prin administrarea unei doze orale (30mg/kg) de metiraponă. A doua zi dimineață se dozează 11-dezoxicortizolul a cărui valoare trebuie să depășească 7 $\mu\text{g/dl}$, la subiecții sănătoși. Testul trebuie efectuat în spital, sub strictă urmărire medicală și de intervenit rapid în caz de insuficiență severă de CSR. Testul este util mai ales la pacienții la care în urma stimulării cu analog sintetic de ACTH valorile obținute sunt normale sau la limită.

Testul de stimulare cu CRH ovin (1 $\mu\text{g/kg}$), este util în evaluarea dinamicii secreției de ACTH. Astfel, la subiecții sănătoși, administrarea pe cale injectabilă, a CRH este urmată de apariția unui peak de ACTH la 15 minute și al unui peak al cortizolului la 30–60 de minute. Pacienții cu insuficiență primară corticosuprarenală vor avea un răspuns exagerat al ACTH la

stimularea cu CRH. Dimpotrivă, în insuficiența secundară corticosuprarenaliană (de cauză hipofizară), secreția ACTH la stimularea cu CRH este absentă. Deoarece acest test nu face întotdeauna o diferențiere clară între subiecții sănătoși și pacienții cu insuficiență secundară corticosuprarenaliană de intensitate medie, în practica curentă se preferă testele descrise anterior.

Hipersecreția de ACTH în organism determină producerea în exces a cortizolului, expresia clinică fiind sindromul Cushing.

Sindromul Cushing, ca manifestare clinică a hipercortizolemiei poate fi exogen (prin administrare prelungită de glucocorticoizi sau ACTH) sau endogen de cauză CSR (adenom sau carcinom), hipofizară – cu hipersecreție de ACTH (boală Cushing) sau non-hipofizară – tumori extrahipofizare secretoare de ACTH (sindrom de ACTH ectopic).

În boala Cushing manifestările clinice sunt secundare hipercorticismului: obezitate facio-tronculară ("facies în lună plină" – este manifestarea cea mai comună care apare la aproximativ 94% din cazuri); la nivel cutanat se constată subțierea pielii prin pierderea collagenului, degradarea elastinei, liză proteică. Alte manifestări includ atrofie musculară, osteoporoză, hirsutism (prezent la 80% din femei secundar hiperandrogenismului sau altor disfuncții gonadice), hipertensiune arterială secundară retenției sodice sau hidrice, etc. Diagnosticul de boală Cushing se suspicionează în prezența unui hipercorticism endogen, cu creșterea eliminărilor urinare de cortizol liber, supresia anormală a cortizolului la administrarea de doze mici de dexametazonă sau valori nocturne crescute ale cortizolului salivar.

19.3 HORMONII HIPOFIZEI POSTERIOARE

Spre deosebire de hipofiza anterioară, hipofiza posterioară nu este o glandă endocrină deoarece conține doar segmentele distale ale axonilor neuronilor situați în nucleii supraoptici și paraventriculari hipotalamici (figura 19.1). Sinteza celor doi hormoni – vasopresina (ADH, hormon antidiuretic) și oxitocina, se realizează la nivelul corpiilor neuronali din nucleii hipotalamici, nucleul supraoptic sintetizând ADH, iar nucleul paraventricular – oxitocină. Din punct de vedere structural, cei doi hormoni sunt nonapeptide (figura 19.3) și sunt sintetizați în corpiile neuronale ai nucleilor hipotalamici (la nivelul ribozomilor), ca prohormoni, ulterior străbat reticulul endoplasmatic și ajung în aparatul Golgi de unde sunt ulterior captați în granule secretoare, care sunt transportate de-a lungul axonilor, către butonii terminali, unde sunt depozitați. În timpul transportului prohormonii sunt scindați de către peptidaze în două fragmente: hormonul activ (ADH și oxitocina) și neurofizinele (I și II, numite și proteine transportoare), care nu au funcție biologică. Sub acțiunea unor stimuli specifici care acționează la nivelul corpiilor neuronilor hipotalamici, hormonii împreună cu neurofizinele, sunt eliberați în plasmă, unde hormonii circulă liberi, nelegați de proteine. Rolul neurofizinelor nu este pe deplin stabilit.

În circulație, hormonii au timp de înjumătățire scurt, de aproximativ 2-4 minute, fiind rapid catabolizați, în special în ficat. O parte din vasopresină se elimină nemodificată prin urină.

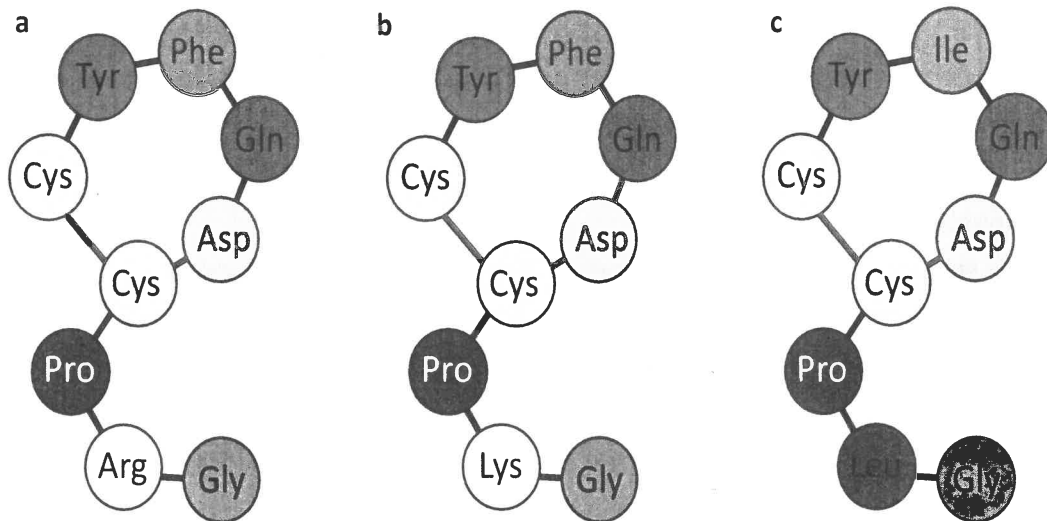


Figura 19.3 Structura hormonilor hipofizei posterioare.
a - Arg-Vasopresina; b - Lys-Vasopresina; c - Oxitocina

19.3.1 VASOPRESINA

Vasopresina este denumită astfel din cauză că la doze farmacologice determină vasoconstricție arteriolară, cu creșterea rezistenței vasculare periferice și în consecință a tensiunii arteriale. Mai corect poartă denumirea de hormon antidiuretic (ADH) deoarece în condiții fiziologice intervine în retenția apei în organism (vezi și capitolul 2.5.2).

Principalul stimul implicat în eliberarea ADH din neurohipofiză este creșterea osmolarității (hemoconcentrație). Osmoreceptorii din hipotamusul anterior sunt stimulați atât de senzația de sete cât și de creșterea osmolarității plasmei și sunt responsabili de secreția de ADH, reabsorbția de apă la nivel renal, cu corectarea osmolarității plasmatice. De aceea se consideră că hipotamusul anterior, prin centrul setei și secreția de ADH este centrul superior ce reglează osmolaritatea sângelui. Hemodiluția (scăderea osmolarității plasmei) are efecte inverse. Alți stimuli implicați în eliberarea ADH sunt stresul, emoțiile, factori farmacologici ca acetilcolina, nicotina, morfina. Adrenalina și etanolul inhibă eliberarea ADH.

Secreția de ADH este influențată și de baroreceptorii din atri, sistemul venos pulmonar, cârja aortei, dar principalele sisteme reglatorii ale tensiunii arteriale sunt sistemul nervos vegetativ și complexul renină-angiotensină-aldosteron.

Acțiunile ADH se realizează prin intermediul a doi receptori membranari specifici V_1 și V_2 . Receptorii V_1 sunt situați extrarenal, la nivelul vaselor de sânge și sunt cuplați cu o proteină de tip Gp și fosfolipaza C, care activată va genera ca mesageri secunzi inozitol trifosfat și diacilglicerol. Acești mediatori sunt responsabili de activarea proteinkinazei C, mobilizarea calciului intracelular, care în final va determina vasoconstricție și hipertensiune. Receptorii V_2 sunt localizați la nivelul epiteliului tubilor contorți distali și colectori ai nefronilor. Receptorii V_2 sunt cuplați cu proteina Gs și adenilat ciclaza. În momentul fixării ADH pe receptor (figura 19.4) în celulă va crește concentrația de AMPc, care va activa proteinkinaza A - responsabilă atât de stimularea expresiei de noi molecule de aquaporină-2 cât și de transferul acestor molecule către polul apical/urinar al membranei celulei tubulare. Aquaporinele sunt pro-

ține canal prin care se transportă moleculele de apă prin membrana hidrofobă a celulelor. În urma creșterii numărului de aquaporine la nivelul celulei renale tubulare, apa se deplasează, de-a lungul gradientului osmotic din interiorul lumenului tubului renal (contort distal și colector), în interiorul celulei tubulare și apoi în spațiul extracelular medular și de aici în circulația sistemică. În acest proces mai sunt implicate și aquaporinele 3 și 4 (poziționate în membrana latero-bazală a celulei tubulare). Astfel, în funcție de necesitățile organismului, expresia aquaporinei-2 este rapid modulată, putând fi ușor exprimată pe suprafața celulelor sau dimpotrivă, internalizată rapid intracelular.

Date mai recente arată că receptorul V_2 este responsabil și de stimularea producției factorului VIII al coagulării. La nivelul adenohipofizei, pe celulele corticotrope s-a descoperit un al treilea receptor pentru ADH – receptorul V_3 care modulează sinteza și eliberarea ACTH.

Anomalii ale secreției ADH

Insuficiența de ADH sau **diabetul insipid** presupune excreția unei cantități mari de urină (diabet) care e hipotonică, diluată și „fără gust” (insipid). Principalul simptom este poliuria care trebuie diferențiată de alte cauze de poliurie, ca de exemplu diureza osmotică din diabetul zaharat, sau din boala renală cronică de origine intrinsecă. Urinările frecvente, fără a fi însoțite de creșterea volumului urinar, sunt de cauză urologică. Majoritatea pacienților vor tolera o poliurie de până la de 3-4 litri pe zi.

În prezența unei poliurii cu urină diluată, trebuie evaluate următoarele situații fiziopatologice: (1) diabet insipid central prin afectarea hipotalamusului și scăderea sintezei de ADH; (2) diabet insipid nefrogen cu incapacitatea rinichiului de-a răspunde la acțiunea ADH; (3) diabetul insipid tranzitoriu din timpul sarcinii secundar catabolizării rapide a ADH; (4) poliuria primară caracterizată prin ingestia în exces de lichide urmată de reacția fiziologică a organismului - poliurie hipotonică.

Diagnosticul diferențial se realizează prin măsurarea volumului urinar pe 24 de ore, dar acest lucru este dificil pentru pacienții la care diureza este excesivă. De aceea se preferă măsurarea volumului de urină la fiecare emisie de urină în paralel cu un test de privare de apă. În timpul deshidratării sau a testului de privare de apă, pacientul cu poliurie primară va elimina o urină cu osmolaritate crescută, fără a-și modifica osmolaritatea plasmei, pe când pacientul cu diabet insipid central va prezenta o osmolaritate crescută a sângelui, fără ca urina să-și modifice osmolaritatea. Testul trebuie făcut sub control medical și la începutul testului pacienții trebuie cântăriți și să li se determine natremia și osmolaritatea plasmei. Pe durata testului pacienții nu au voie să consume nici lichide nici alimente. La fiecare emisie de urină se măsoară volumul de urină eliminat și se măsoară osmolaritatea urinară și pacientul este re-cântărit. Când diferența dintre osmolaritatea urinară este mai mică de 10% la două urinări consecutive, iar pacientul a pierdut 2% din masa sa corporală, se recoltează sânge pentru determinarea natriemiei cât și a ADH. Ulterior pacientului i se administrează 2mcg de desmopresină (analog sintetic de ADH) iar volumul urinar și osmolaritatea urinară sunt măsurate după două ore. Durata testului variază, dar la majoritatea subiecților normali

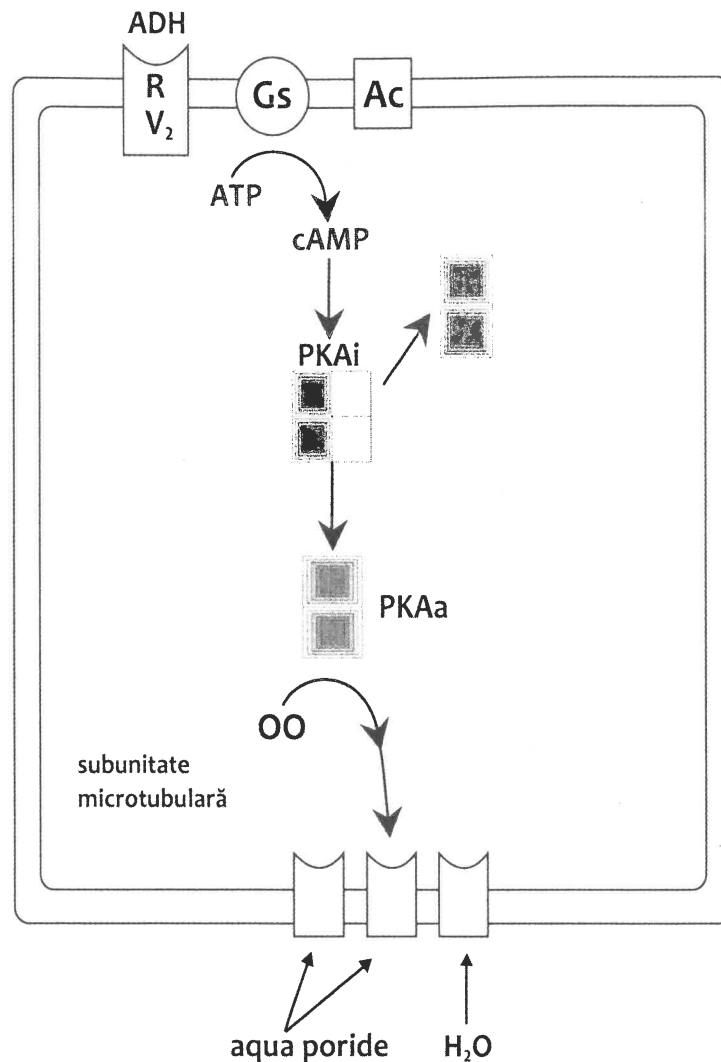


Figura 19.4 Mecanismul de acțiune al ADH la nivel renal

osmolaritatea urinară începe să crească și în aproximativ 18 ore atinge un platou. Testul este întrerupt dacă pacienții pierd mai mult de 3% din greutatea lor corporală. Dacă pacientul este deshidratat, cu hiperosmolaritate plasmatică, dar urina este diluată, atunci pacientului i se recoltează sânge pentru determinarea vasopresinei și i se face testul cu desmopresină (figura 19.5). La pacienții cu polidipsie primară osmolaritatea urinară începe să crească și atinge un platou la aproximativ 700mOsm/kg, dar nu răspund la administrarea de desmopresină (osmolaritatea urinară rămâne neschimbată). Pacienții cu diabet insipid central (de cauză hipotalamică) au, la sfârșitul testului de privare cu apă, niveluri nedetectabile sau scăzute ale ADH în sânge, osmolaritatea urinară este foarte scăzută (rinichiul nu este capabil să concentreze urina), dar în urma administrării de desmopresină osmolaritatea urinară crește cu cel puțin 50% (cel mai frecvent cu 200 - 400%) (figura 19.5). Pacienții cu diabet insipid nefrogen – ca și cei cu diabet insipid central - nu concentrează urina în timpul testului de privare de apă. În schimb valoarea ADH sangvin, la sfârșitul testului de privare de apă este crescută (uneori și peste 5 pg/ml), iar la administrarea de desmopresină osmolaritatea urinară nu crește.

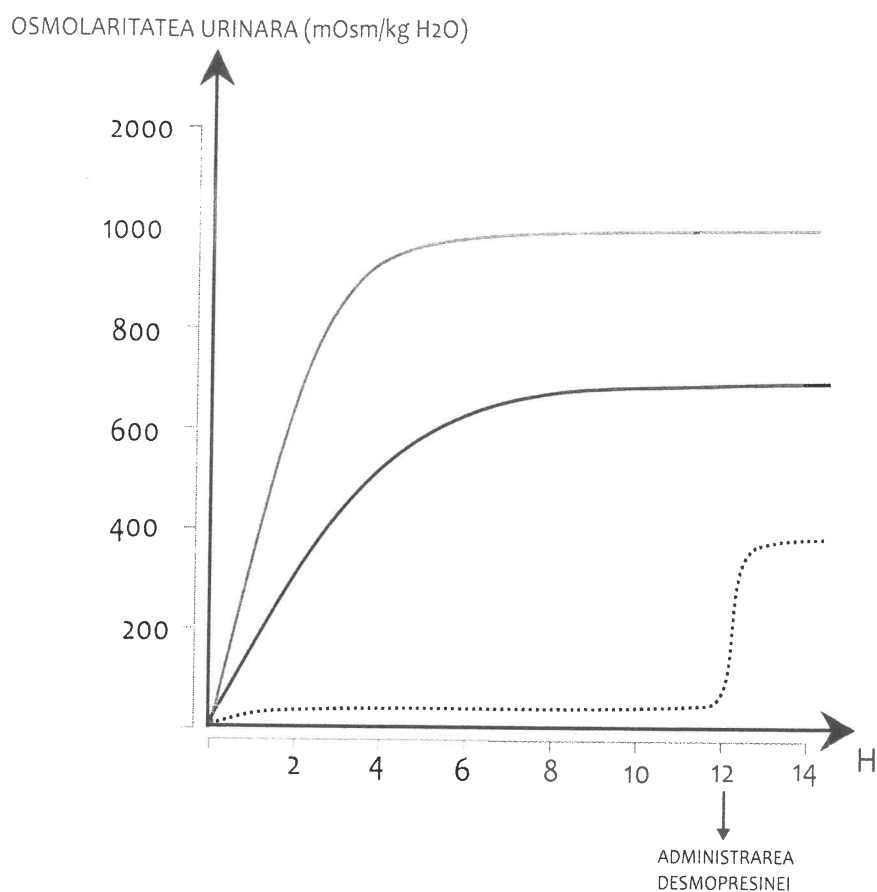


Figura 19.5 Testul de privare de apă urmat de administrarea desmopresinei
 (în verde -răspuns normal/fiziologic, în albastru - poliuria primară,
 în roșu - diabet insipid central, în negru - diabet insipid nefrogen)

Cauzele diabetului insipid sunt multiple: genetice, traumatisme, tumori primare sau metastaze la nivelul hipotalamusului și/sau hipofizei.

Diabetul insipid nefrogen poate fi congenital sau câștigat. Forma congenitală se poate prezenta sub două variante: una recesivă X-lincată, caracterizată prin mutații la nivelul receptorilor V_2 ai ADH de la nivel renal (90% din cazuri) și o variantă autosomal recesivă caracterizată prin mutații la nivelul aquaporinei-2. Forma câștigată de diabet insipid este datorată maladiilor renale care determină o modificare ireversibilă a arhitectonicii normale a nefronului cu incapacitatea acestuia de-a mai menține osmolaritatea normală a plasmei (rinichiul polichistic, infarctul renal, drepanocitoza prin hipoxia cronică indusă în întreg organismul și deci și la nivel renal).

Hipersecreția de ADH și/sau secreția inadecvată de ADH ce determină imposibilitatea rinichilor de a dilua urina și în consecință hiperhidratarea organismului, cu hiponatremie (cunoscută sub denumirea de sindrom Parhon sau sindrom Schwartz-Bartter). O cauză a acestui sindrom poate fi de natură "iritativă" prin orice proces intracranian (inflamator, vascular, tumoral, metabolic) care afectează și hipotalamusul (sindromul de secreție inadecvată de ADH). O altă cauză poate fi hipersecreția de ADH sau sinteza unor peptide ADH-like de către diverse tumori, sau după tratamentul diabetului insipid și ingestie excesivă de apă.

19.3.2 OXITOCINA

Oxitocina sau ocitocina este un nonapeptid a cărei sinteză se aseamănă cu cea descrisă la ADH. Deși probabil o serie de acțiuni ale neuronilor centrali au fost atribuite oxitocinei (acționând ca neurotransmițător), toși rolul său fiziologic este în declanșarea nașterii și ulterior în lactație. Receptorii pentru oxitocină se găsesc atât la nivel uterin cât și la nivelul glandei mamare. Estrogenii stimulează expresia receptorilor pentru oxitocină la nivel uterin, pe când progesteronul are efecte diferite. În timpul sarcinii, concentrația de progesteron este crescută, numărul de receptori pentru oxitocină sunt diminuați, iar oxitocina produsă este rapid degradată de peptidaze, astfel încât miometrul uterin este menținut relaxat (la acest fenomen participând și alte peptide miorelaxante, ca de exemplu relaxina). Pe măsură ce sarcina se apropie de termen, concentrația de progesteron începe să scadă și concentrația de estrogeni să crească. Estrogenii sunt responsabili de pregătirea organismului pentru naștere, iar în contracția uterină cu relaxarea și dilatarea colului uterin un rol major îl are oxitocina, dar și alte molecule care acționează paracrin sau autocrin: prostaglandine, endoteline, CRH, glucocorticoizi, citokine.

La nivelul glandei mamare receptorii pentru oxitocină sunt localizați la nivelul celulelor mioepiteliale care înconjură ductele alveolare. Suptul sau stimularea mamelonului postpartum, va determina pe cale nervoasă stimularea producerii oxitocinei, care se va descărca pulsatil determinând contracția acestor celule cu ejeția laptelui.

Bibliografie selectivă

1. Beladi Mousavi SS, Tamadon MR, *Vasopressin and prevention of hypotension during hemodialysis*, Iran Red Crescent Med J. 2014 Nov 5;16(11).
2. de Fost M, Oussaada S, Endert E, Linthorst G, Serlie M, Soeters M, DeVries JH, Bisschop P, Fliers E *The water deprivation test to differentiate diabetes insipidus from primary polydipsia*. Endocr Connect. 2015 Feb 23, doi:10.1530/EC-14-0113.
3. Gardner DG, Shoback D, *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*, Mc Grow Hill Medical, 8th Ed, 2004.
4. <http://www.lefo.ro/aelbiologie.lefo.ro/biologie/USC>
5. <http://arbl.cvmb.colostate.edu/>
6. Jerca L, Ungureanu D. *Biochimia hormonilor*, Ed. Terra nostra, Iași, 2001.
7. Kaplan A.L., Pesce A.J. *Clinical chemistry: theory, analysis, correlation*, Mosby Inc., 5th Ed, 2010, p.929-947.
8. Marshall W.J., Bangert S.K., Lapsley M., *Clinical chemistry*, Mosby Inc., 7th Ed, 2012, p. 117-136.

20

Hormonii tiroidieni

Elena Petrescu-Dănilă

Hormonii tiroidieni îndeplinesc roluri esențiale în creștere, diferențiere și metabolism, fiind necesari pentru funcționarea normală a majorității țesuturilor. Glanda tiroidă este una din cele mai mari glande endocrine, având o greutate de 15-20 g și este formată din doi lobi, drept și stâng, uniți prin intermediul istmului tiroidian. Histologic este alcătuită din foliculii tiroidieni, formați din celule epiteliale cuboidale dispuse pe un singur strat (celule foliculare tiroidiene sau tirocite) care delimitează un lumen ce conține coloidul tiroidian. La nivelul foliculilor tiroidieni are loc sinteza hormonilor tiroidieni: T_3 (*triiodotironina*) și T_4 (*tetraiodotironina* sau *tiroxina*). Pe lângă celulele foliculare, tiroida mai conține și celule parafoliculare (sau celule C) care au rolul de a sintetiza un alt hormon, calcitonina.

20.1 SINTEZA HORMONILOR TIROIDIENI

Hormonii tiroidieni au ca trăsătură distinctivă prezența unui oligoelement în structura lor și anume iodul, absolut necesar pentru activitatea lor biologică. Precursorul hormonilor tiroidieni este *tiroglobulina*, o glicoproteină din coloidul tiroidian care conține 134 resturi de tirozină și care se prezintă sub formă de homodimer, având o greutate moleculară de 660 kDa. Tiroglobulina este sintetizată în tirocite și ulterior secretată în lumenul folicular prin exocitoză. Procesul de sinteză a hormonilor tiroidieni cuprinde mai multe etape (Figura 20.1).

20.1.1 CAPTAREA ȘI CONCENTRAREA IONILOR DE IODURĂ

Aportul normal de iod este cuprins între 150 și 200 $\mu\text{g}/\text{zi}$, iodul găsindu-se în alimente sub formă anorganică de ioni de iodură (I^-). După absorbția din tractul gastro-intestinal, aproximativ 20-30% din iod este captat selectiv în glanda tiroidă, restul fiind eliminat pe cale renală. Pătrunderea iodului din capilarele sanguine în celulele foliculare tiroidiene are loc împotriva gradientului de concentrație și electric, printr-un mecanism de transport energo-dependent. Acest transport este mediat de *simporterul* Na^+/I^- (NIS), o proteină situată în membrana bazală a tirocitelor, care conține 13 segmente transmembranare. Simporterul leagă un ion de I^- și doi ioni de Na^+ pe fața externă a membranei și îi eliberează pe fața sa citosolică. Na^+ internalizat este pompat în afara celulei de către Na^+, K^+ -ATPaza, în felul acesta menținându-se gradientul electrochimic al ionului de Na^+ . Acest gradient permite transportul ionului de I^- împotriva gradientului său electrochimic.

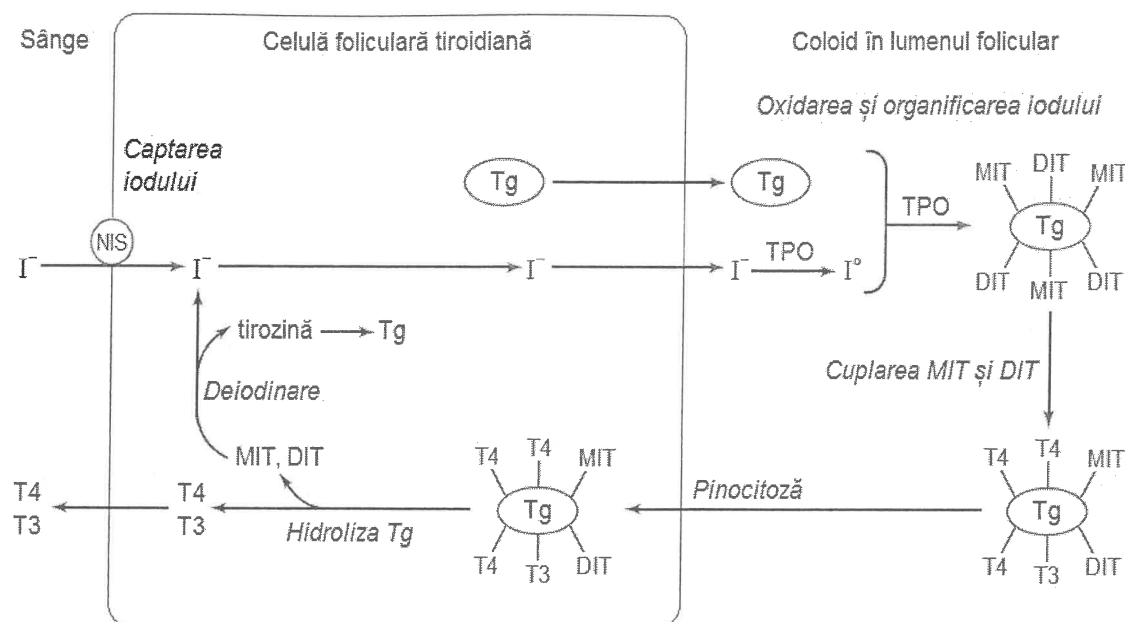


Figura 20.1 Sinteza și secreția hormonilor tiroidieni.
NIS, simporter Na^+/I^- ; Tg, tiroglobulină; TPO, tiroperoxidază.

Ca urmare a acțiunii simporterului Na^+/I^- , are loc o concentrare a ionilor de iodură în glanda tiroidă, astfel încât concentrația acestora în celulele foliculare este de aproximativ 30 de ori mai mare decât în sânge, în condiții fiziologice. Această concentrare poate crește semnificativ, până la de 250 de ori, în condițiile unei activități maxime a glandei tiroide, ca urmare a stimulării prin TSH.

Mecanismul de captare a iodului este inhibat competitiv de anumiți anioni care folosesc același sistem de transport: perclorat (ClO_4^-), pertechnețat (TcO_4^-) și tiocianat (SCN^-). Acești compuși pot fi utilizați, sub formă de izotopi radioactivi, în diverse tehnici de explorare a funcției tiroidiene, cum ar fi studierea transportului ionilor de iodură sau diagnosticarea deficiențelor de organificare.

20.1.2 OXIDAREA IONILOR DE IODURĂ

Ionii de I^- captați în tirocite sunt convertiți într-o formă activă prin oxidare, proces obligatoriu în cadrul sintezei hormonilor tiroidieni. Oxidarea I^- este catalizată de *tiroperoxidază* (TPO), o hemoproteină tetramerică având o greutate moleculară de 110 kDa, care este legată de membrana apicală a tirocitelor și are domeniul catalitic orientat spre lumenul folicular. Tiropoxidaza necesită peroxid de hidrogen ca agent oxidant, acesta fiind furnizat de un sistem generator de H_2O_2 și anume o NADPH oxidază similară celei existente în leucocite. TPO catalizează următoarea reacție în care ionul de iodură este oxidat la iod elemental:



Există unii compuși care inhibă oxidarea ionilor de I^- și, deci, încorporarea lor ulterioară în molecula tiroglobulinei. Aceștia sunt derivați de tiouree (propiltiouracil, carbimazol, metimazol) și sunt utilizați în terapie pentru a inhiba sinteza hormonilor tiroidieni la nivelul acestei etape.

20.1.3 IODINAREA UNOR RESTURI DE TIROZINĂ DIN TIROGLOBULINĂ (ORGANIFICAREA IODULUI)

Iodul oxidat reacționează cu unele resturi de tirozină din componența tiroglobulinei, acest proces având loc sub acțiunea tiroperoxidazei. Mai întâi este iodinată poziția 3, cu formare de MIT (monoiodtirozină) și ulterior poziția 5, cu formare de DIT (diiodtirozină). Iodinarea este însoțită de modificarea conformațională a moleculei de tiroglobulină și formarea unor punți disulfidice. Aproximativ 25% din resturile de tirozină ale tiroglobulinei sunt supuse procesului de iodinare.

20.1.4 CUPLAREA RESTURILOR IODOTIROZIL

La interfața celulă foliculară-coloid are loc cuplarea intramoleculară a câte două resturi iodotirozil, cu formarea de resturi iodotironil. Cuplarea a două resturi DIT dă naștere la T_4 (3,5,3',5'-tetraiodotironină), iar cuplarea unui rest DIT cu un rest MIT formează T_3 (3,5,3'-triiodotironina) (Figura 20.2). În condiții normale, mai puțin de 50% din resturile iodotirozil din componența tiroglobulinei suferă cuplare și se formează predominant T_4 , raportul $T_4:T_3$ fiind ≥ 10 . Procesul de cuplare este catalizat de tiroperoxidază, prin stimularea formării de radicali liberi ai resturilor iodotirozil. Implicarea tiroperoxidazei și în această etapă este dovedită de faptul că acei compuși care inhibă oxidarea I^- inhibă, de asemenea, și etapa de cuplare. Hormonii tiroidieni astfel formați rămân, temporar, ca parte integrantă din molecula tiroglobulinei și sunt stocați în acest mod în lumenul folicular.

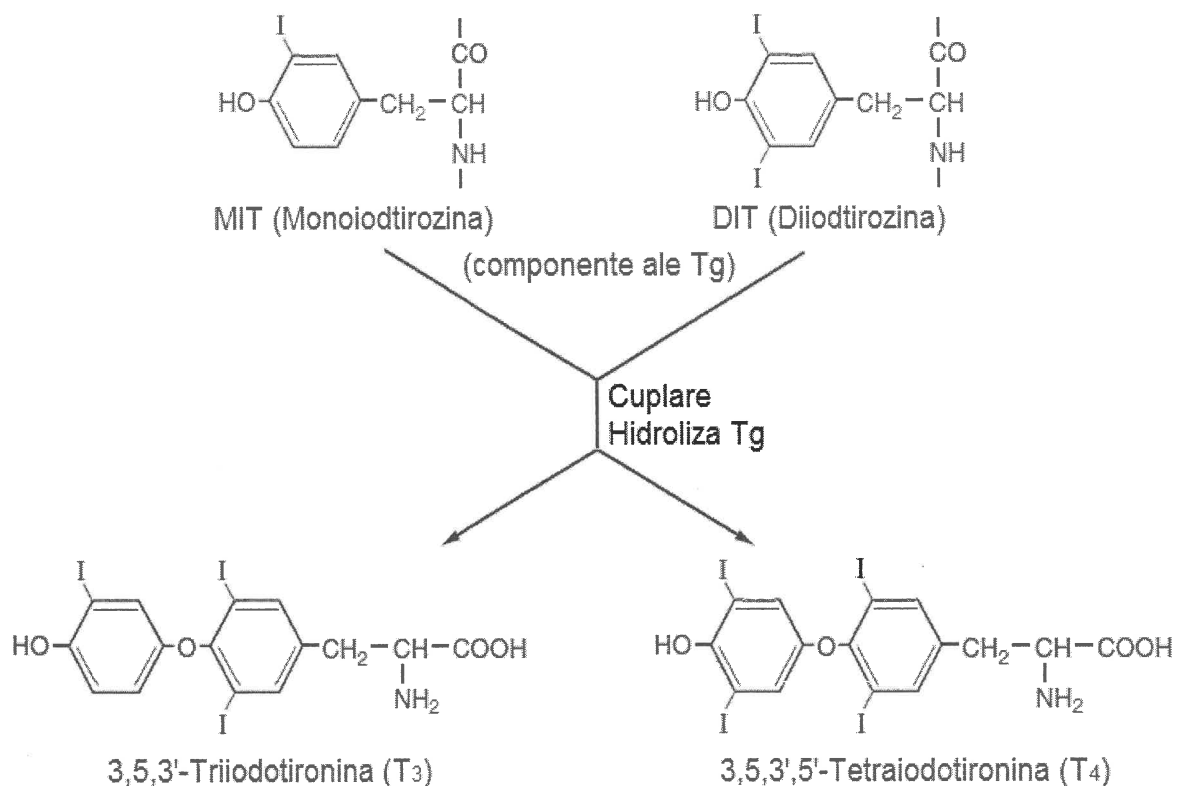


Figura 20.2 Formarea hormonilor tiroidieni T_3 și T_4 prin cuplarea MIT și DIT.

Tg, tiroglobulină.

20.1.5 PROTEOLIZA TIROGLOBULINEI ȘI SECREȚIA HORMONILOR TIROIDIENI

În urma stimulării tirocitelor cu TSH, tiroglobulina conținând hormonii tiroidieni este captată din coloid în tirocite prin endocitoză și inclusă în vezicule endocitice. Aceste vezicule fuzionează cu lizozomii pentru a forma fagolizozomi, care vor traversa celula spre membrana sa bazală. Enzimele lizozomale hidrolizează tiroglobulina și eliberează T_4 , T_3 , MIT și DIT. Acestea sunt eliberate în citosol, iar T_4 și T_3 difuzează prin membrana bazală a tirocitelor și trec în circulația sanguină. Secreția glandei tiroide constă în principal din T_4 , care reprezintă peste 90% din total.

MIT și DIT nu sunt secretați în circulație, ci sunt rapid deiodinați iar iodul este reciclat în interiorul celulei foliculare. De asemenea, o mică parte din tiroglobulină este eliberată din tirocite, printr-un mecanism neelucidat, astfel încât plasma indivizilor normali conține tiroglobulina detectabilă într-o concentrație de 15-25 $\mu\text{g/l}$.

20.2 REGLAREA SINTEZEI ȘI SECREȚIEI HORMONILOR TIROIDIENI

Pentru a menține un nivel optim al hormonilor tiroidieni în sânge, care să asigure homeostazia proceselor metabolice și fiziologice, atât sinteza cât și secreția hormonilor tiroidieni sunt supuse unor mecanisme de reglare.

20.2.1 REGLAREA PRIN INTERMEDIUL SISTEMULUI HIPOTALAMO-HIPOFIZAR

Acest mecanism reglator este asigurat de către TSH hipofizar și TRH hipotalamic.

TSH (hormonul stimulator al tiroidei, tiotropina) este secretat de celulele tirotrope din lobul anterior al hipofizei și joacă un rol esențial în reglarea creșterii și funcției glandei tiroide. Este un hormon glicoproteic care conține două lanțuri, α și β , având o greutate moleculară de 28 kDa. Lanțul α este identic cu cel al altor hormoni glicoproteici hipofizari (FSH și LH), precum și cu cel al gonadotropinei corionice umane (hCG). Lanțul β este unic pentru TSH și conferă activitatea biologică.

TSH stimulează majoritatea proceselor implicate în sinteza și secreția hormonilor tiroidieni: crește activitatea simporterului Na^+/I^- și, deci, captarea iodului; stimulează iodinarea resturilor de tirozină din componența tiroglobulinei; intensifică endocitoza și proteoliza tiroglobulinei iodinate. Rezultatul global al acestor efecte este creșterea eliberării T_4 și T_3 în circulație. Pe termen lung, TSH promovează sinteza proteică în celulele foliculare tiroidiene, menținându-le dimensiunile și integritatea structurală. Expunerea cronică a unui individ la cantități excesive de TSH determină mărirea de volum a tiroidei, ca urmare a creșterii dimensiunilor și numărului tirocitelor.

Acțiunea TSH este mediată de un receptor specific situat în membrana plasmatică a tirocitelor, care face parte din familia receptorilor heptahelicali cuplați cu proteine G. Receptorul TSH acționează preponderent pe calea de semnalizare dependentă de proteina G_s , care include stimularea adenilat ciclazei, creșterea concentrației AMP ciclic și activarea protein kinazei A. O altă cale de semnalizare utilizată este cea dependentă de proteina G_q ,

care presupune activarea fosfolipazei C, cu generarea a doi mesageri secunzi, diacilglicerol și inozitol trifosfat și creșterea concentrației calciului citosolic. Au fost descrise mutații în domeniul amino-terminal extracelular al receptorului pentru TSH, care duc la hipotiroidism. De asemenea, au fost descrise mutații activatoare în receptorul TSH la indivizii cu noduli tiroidieni autonomi și cu hipertiroidism congenital familial.

Eliberarea TSH din hipofiza anterioară este stimulată de către **TRH** (hormon de eliberare a tiotropinei) produs de hipotalamus. TRH este un tripeptid eliberat din celule neurosecretorii din hipotalamus în capilarele sistemului port hipotalamo-hipofizar, fiind transportat la celulele tirotrope din adenohipofiză. Aici se leagă de un receptor specific pentru TRH, care este un membru al familiei de receptori membranari heptahelicali și este cuplat cu proteina G_q . Stimularea de către TRH a celulelor hipofizare tirotrope duce la creșterea atât a eliberării TSH, cât și a sintezei de noi molecule de TSH.

Concentrația hormonilor tiroidieni în circulație este reglată printr-un *mecanism homeostatic de tip feedback* care implică axul hipotalamo-hipofizo-tiroidian. Astfel, creșterea nivelului plasmatic al hormonilor tiroidieni peste limitele fiziologice duce la inhibiția eliberării de TSH hipofizar și de TRH hipotalamic, precum și la reducerea răspunsului celulelor hipofizare tirotrope la TRH. Ca urmare, concentrația plasmatică a T_3 și T_4 va fi readusă la normal. Pe de altă parte, când nivelul circulant al hormonilor tiroidieni este scăzut, are loc o creștere a numărului de receptori pentru TRH și a sintezei TSH în celulele hipofizare tirotrope, ducând la creșterea răspunsului TSH la TRH.

Secreția TSH din adenohipofiză este influențată și de o serie de factori diverși. Astfel, expunerea la frig reprezintă un stimul important pentru creșterea secreției TRH și, deci, a TSH. De asemenea, estrogenii determină creșterea secreției TSH și deci a activității glandei tiroide. Pe de altă parte, reacțiile emoționale intense sau stresul pot determina scăderea secreției de TRH și TSH, exercitând un efect indirect asupra secreției hormonilor tiroidieni. Eliberarea TSH mai este inhibată de somatostatina, dozele farmacologice de glucocorticoizi, precum și în cursul stării de inanție.

20.2.2 ACȚIUNEA REGLATORIE A IODULUI

Glanda tiroidă este capabilă să-și ajusteze capacitatea de sinteză a hormonilor tiroidieni în funcție de aportul de iod. Aceasta se realizează printr-un mecanism de feedback intern care controlează gestionarea intracelulară a iodului și răspunsul tiroidei la TSH. Astfel, când aportul de iod este scăzut, tiroida realizează o utilizare maximă a iodului ca urmare a sporirii eficienței în procesarea iodului și a unui răspuns mai pronunțat la TSH. Pe de altă parte, în cazul unui aport crescut de iod, tiroida se autoprotejează împotriva unei supraproducții hormonale prin reducerea utilizării iodului. Cantitatea crescută de iod din tirocite are un efect inhibitor asupra mai multor aspecte: rata de captare a iodului, organizarea iodului (probabil ca urmare a inhibiției tiroperoxidazei), hidroliza tiroglobulinei și responsivitatea la TSH.

20.3 TRANSPORTUL PLASMATIC ȘI METABOLISMUL HORMONILOR TIROIDIENI

Având caracter liposolubil, hormonii tiroidieni circulă în plasmă legați de proteine transportoare în proporție de peste 99%. Proteinele implicate în transportul hormonilor tiroidieni sunt TBG, TBPA și albumina.

TBG (thyroxine-binding globulin) este principala proteină de transport al hormonilor tiroidieni. Este o glicoproteină cu greutatea moleculară de 63 kDa, având mobilitate electroforetică între fracțiunile α_1 - și α_2 -globulinice. TBG are afinitate mare pentru T_4 (constanta de disociere $K_d = 50$ pM) și afinitate moderată pentru T_3 ($K_d = 500$ pM). La concentrații normale de hormoni tiroidieni, TBG este saturată în proporție de o treime.

TBPA (thyroxine-binding prealbumin), cunoscută și ca *transtiretina*, fiind implicată și în transportul retinolului are afinitate de 100 de ori mai mică pentru T_4 în comparație cu TBG și transportă numai T_4 circulant, nefiind implicată în transportul T_3 . Cea mai mare parte a T_4 și T_3 care nu circulă legate de TBG sau TBPA sunt transportate de către *albumină*.

La indivizii normali, T_4 circulă legat în proporție de 80% de TBG, 15% de TBPA și 5% de albumină, iar T_3 circulă legat în proporție de 90% de TBG și 10% de albumină. *Fracțiunea nelegată* a hormonilor tiroidieni (0,03% din T_4 și 0,3% din T_3) este responsabilă de activitatea biologică a acestora, putând fi captată în celulele țintă. Deși concentrația T_4 total este de aproximativ 50 de ori mai mare față de T_3 total, concentrația T_4 liber este de numai 2-3 ori mai mare față de T_3 liber, datorită proporției diferite în care cei doi hormoni sunt legați de proteine. Timpul de înjumătățire în plasmă este mai mare pentru T_4 (aproximativ 7 zile) comparativ cu T_3 (1 zi).

Metabolismul hormonilor tiroidieni constă în procesul de deiodinare, catalizat de deiodinaze, enzime ce conțin seleno-cisteină în centrul activ. Aproximativ 40% din T_4 este transformat în T_3 prin 5'-deiodinare, iar 40% din T_4 este convertit în rT_3 (reverse T_3 sau 3,3',5'-triiodotironina, compus lipsit de activitate biologică) prin 5-deiodinare (Figura 20.3). Majoritatea T_3 circulant (aproximativ 85%) rezultă prin deiodinarea T_4 , astfel încât T_4 poate fi considerat un prohormon pentru T_3 .

Există două tipuri de 5'-deiodinaze: I și II. *5'-Deiodinaza tip I (D1)* este prezentă în ficat, rinichi și tiroidă și majoritatea T_3 circulant este rezultatul acțiunii sale, enzima producând T_3 în vederea exportului către alte celule. Enzima este inhibată de către propiltiouracil, acest compus fiind și un inhibitor al sintezei hormonilor tiroidieni. *5'-Deiodinaza tip II (D2)* este prezentă în hipofiză, creier, mușchi și tiroidă. Ea este responsabilă pentru convertirea T_4 în T_3 în vederea utilizării intracelulare. Activitatea acestei enzime este crescută în hipotiroidism și scăzută în hipertiroidism, ea fiind inhibată de către T_4 . Procesul de transformare a T_4 în T_3 este influențat de diverși factori: bolile debilitante, postul prelungit, β -blocantele și amiodarona scad această conversie, în timp ce medicamentele care induc activitatea enzimelor hepatice, cum este fenitoina, o cresc.

5-Deiodinaza este o deiodinază de *tip III (D3)* și este implicată în inactivarea T_4 prin transformare în rT_3 , precum și în degradarea T_3 prin deiodinare la 3,3'-diiodotironină (T_2). Enzima

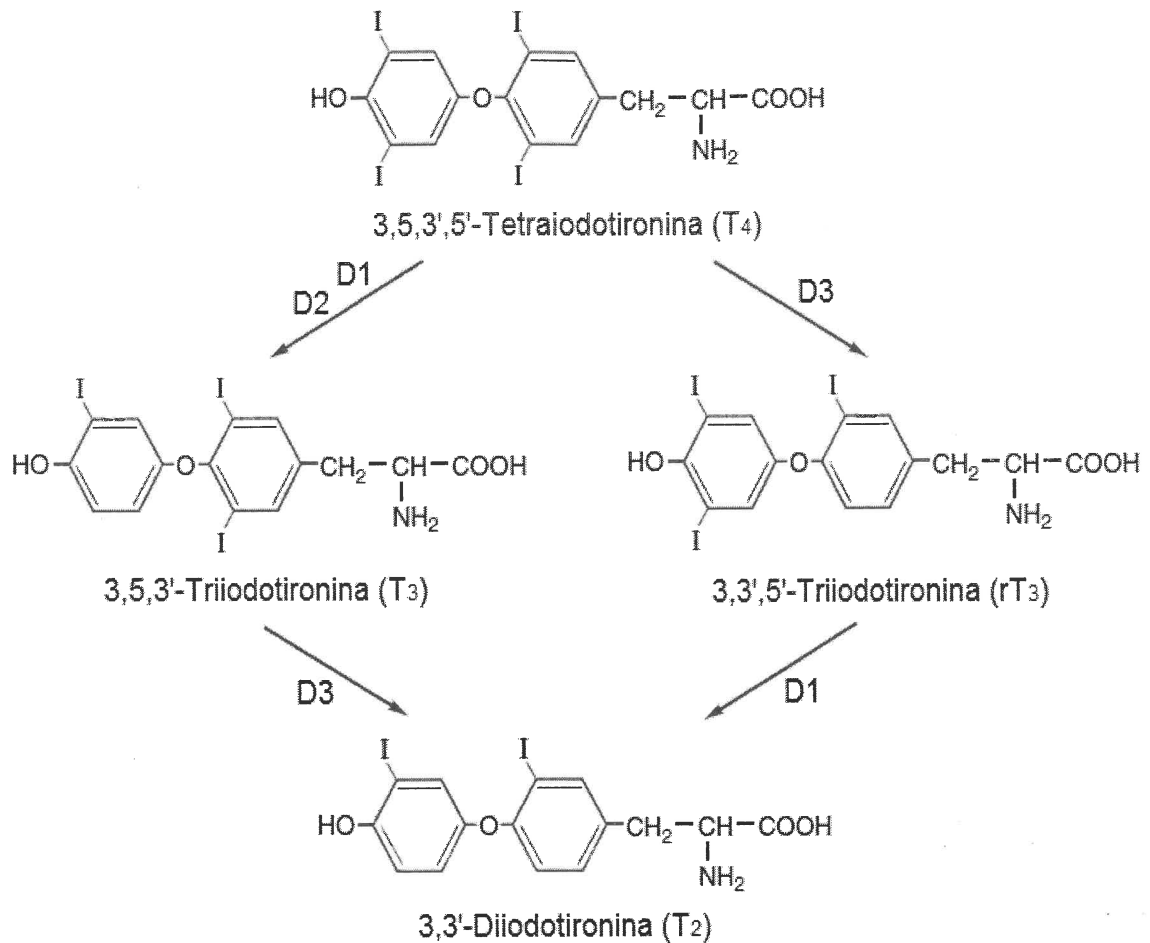


Figura 20.3 Metabolismul hormonilor tiroidieni prin deiodinare progresivă.

este larg distribuită în țesuturi și activitatea sa nu este influențată de factorii care afectează deiodinazele de tip I și II. rT₃ este deiodinat la 3,3'-T₂ sub acțiunea D1, iar T₂ este deiodinată în continuare la monoiodotironină (T₁).

Deiodinarea T₄, T₃ și rT₃ este responsabilă de 80% din metabolismul acestora. Restul de 20% constă în conjugarea hormonilor tiroidieni în ficat cu acidul UDP-glucuronic sau cu sulfat, derivații conjugați fiind excretați prin bilă și prin urină.

Iodul rezultat în urma deiodinării hormonilor tiroidieni este eliberat în plasmă și excretat prin urină (aproximativ 500 μg/zi) și bilă (10-15 μg/zi), sau este recaptat de glanda tiroidă pentru resinteza hormonilor tiroidieni (aproximativ 100 μg/zi).

20.4 ACȚIUNILE BIOLOGICE ALE HORMONILOR TIROIDIENI

Hormonii tiroidieni își exercită efectele asupra celulelor țintă prin intermediul unor receptori specifici cu localizare intranucleară. T₃ se leagă la acești receptori cu afinitate de 10 ori mai mare față de T₄, astfel încât T₃ are activitate biologică semnificativ mai mare față de T₄. Acțiunile hormonilor tiroidieni sunt, în majoritate, rezultatul modificării transcripției genice. De asemenea, hormonii tiroidieni cresc responsivitatea tisulară la catecolamine, în special la nivelul sistemului cardiovascular și a sistemului nervos central.

20.4.1 EFECTE ASUPRA METABOLISMULUI INTERMEDIAR

Hormonii tiroidieni stimulează activitatea metabolică în aproape toate țesuturile organismului, având ca efect principal creșterea ratei de utilizare a nutrienților pentru generarea de energie. Atunci când sunt secretați în cantități mari, hormonii tiroidieni pot crește rata metabolică bazală și consumul de oxigen cu 60-100%, în timp ce în hipotiroidism rata metabolică bazală scade cu până la 50%. Stimularea tisulară prin hormoni tiroidieni duce la creșterea numărului și dimensiunilor mitocondriilor, precum și a activității acestora prin creșterea sintezei enzimelor din lanțul respirator.

Efecte asupra ficatului. Hormonii tiroidieni stimulează degradarea glucozei prin glicoliză și sporesc indirect producția hepatică de glucoză, prin creșterea sensibilității hepatocitelor la acțiunea glicogenolitică și gluconeogenică a adrenalinei. T_3 și T_4 stimulează sinteza colesterolului (prin inducția HMG-CoA reductazei), transformarea colesterolului în acizi biliari și lipogeneza (prin inducția malic enzimei și a glucozo-6-fosfat dehidrogenazei, implicate în generarea de NADPH necesar sintezei de acizi grași, precum și a acid gras sintazei).

Efecte asupra țesutului adipos. T_3 și T_4 cresc disponibilitatea de glucoză în celula adipoasă, favorizând astfel sinteza de acizi grași și de glicerol-3-fosfat și, deci, sinteza de trigliceride. Lipogeneza este stimulată și direct, prin inducția malic enzimei, acetil-CoA carboxilazei și a acid gras sintazei. Pe de altă parte, hormonii tiroidieni au un efect de facilitare a acțiunii lipolitice a adrenalinei asupra adipocitului.

Efecte asupra mușchiului scheletic. Hormonii tiroidieni cresc captarea glucozei în celulele musculare și sensibilizează aceste celule la acțiunea glicogenolitică a adrenalinei. Ca urmare, este favorizat consumul glucozei prin glicoliză. De asemenea, hormonii tiroidieni stimulează sinteza proteică și, deci, creșterea țesutului muscular, prin acțiunea lor de stimulare a expresiei genice.

Efecte asupra pancreasului. T_3 și T_4 cresc sensibilitatea celulelor β ale pancreasului endocrin la stimulii care promovează eliberarea insulinei, ei fiind necesari pentru o secreție optimă a acesteia.

Efecte asupra nivelului lipidelor plasmaticice. Hormonii tiroidieni scad colesterolemia prin creșterea numărului de receptori LDL în țesuturi (stimulează expresia genei care codifică acest receptor). Ei reglează și expresia unor enzime implicate în metabolismul colesterolului, cum sunt colesterol ester hidrolaza și acil-CoA colesterol acil transferaza (ACAT). De asemenea, hormonii tiroidieni stimulează lipaza hepatică, ce transformă HDL_2 în HDL_3 și lipoprotein lipaza, cu rol în clearance-ul trigliceridelor din chilomicroni și VLDL.

20.4.2 EFECTELE CALORIGENICE

Hormonii tiroidieni stimulează activitatea Na^+, K^+ -ATPazei, iar pe termen lung cresc sinteza acesteia în mai multe țesuturi (ficat, mușchi scheletic, miocard, țesut adipos, rinichi). Această enzimă realizează aproximativ 20-30% din consumul de ATP al celulelor în condiții obișnuite. Activarea sa va duce la creșterea hidrolizei ATP urmată de scăderea nivelului intracelular al acestuia, ceea ce stimulează oxidarea combustibililor metabolici, ducând la creșterea ratei metabolice bazale. Prin cuplare cu lanțul respirator, va avea loc generarea suplimentară de

ATP în procesul fosforilării oxidative, dar și generarea de căldură (numai aproximativ 40% din energia rezultată prin degradarea combustibililor este convertită în ATP, restul este disipată sub formă de căldură și contribuie astfel la procesul termogenezei).

20.4.3 EFECTE ASUPRA SISTEMULUI CARDIOVASCULAR

Hormonii tiroidieni cresc forța și frecvența de contracție a miocardului (efect inotrop și cronotrop pozitiv) și, ca urmare, sporesc debitul cardiac. În miocardul ventricular, hormonii tiroidieni reglează transcripția unor gene care codifică proteine esențiale pentru funcția cardiacă, precum lanțurile grele ale miozinei (MHC) și cresc activitatea Ca^{2+} -ATPazei din reticulul sarcoplasmic. De asemenea, ei reglează expresia unor proteine implicate în transportul cationilor printre care canalul de potasiu voltaj-dependent și Na^+ , K^+ -ATP-aza. Efectele hormonilor tiroidieni asupra miocardului sunt realizate și printr-un alt mecanism și anume reglarea numărului de receptori β -adrenergici în cord și, astfel, creșterea sensibilității la catecolamine.

20.4.4. EFECTE ASUPRA CREȘTERII ȘI MATURĂRII

Aceste efecte se realizează atât prin acțiune directă asupra unor gene țintă, cât și prin creșterea acțiunii hormonului de creștere și stimularea producției de IGF-I de către ficat.

Hormonii tiroidieni sunt esențiali pentru creșterea și dezvoltarea *osoasă*. Ei cresc cantitatea de fosfatază alcalină, osteocalcină și collagen (implicate în formarea matricei osoase) în osteoblaste. În hipotiroidismul infantil, creșterea longitudinală este sever întârziată ca urmare a apariției întârziate a centrilor de osificare în oasele lungi. Nanismul rezultat este caracterizat prin menținerea raportului crescut între partea superioară și cea inferioară a corpului, caracteristică perioadei copilăriei.

Hormonii tiroidieni sunt esențiali pentru dezvoltarea și maturarea *sistemului nervos central*, fiind necesari pentru creșterea axonală și pentru procesul de mielinizare. Aceste efecte sunt realizate prin stimularea sintezei proteinei bazice a mielinei, a unor factori neurotropici și a unor enzime implicate în metabolismul cerebral. Deficitul hormonilor tiroidieni în cursul dezvoltării fetale, cauzat de hipotiroidismul matern netratat, duce la existența deficitului neurologic la nou născut, în timp ce hipotiroidismul congenital netratat duce la retard mental.

Hormonii tiroidieni au și efecte asupra *sistemului reproductiv*, ei crescând nivelul plasmatic al hormonilor androgeni prin stimularea producției de TeBG (globulina de legare a testosteronului) în ficat.

20.5 MECANISMUL DE ACȚIUNE AL HORMONILOR TIROIDIENI

Deși sunt compuși lipofilici, pătrunderea hormonilor tiroidieni din plasmă în celule nu se realizează prin difuziune pasivă. Ei sunt captați în celulele țintă cu ajutorul unor proteine transportoare specifice, saturabile: transportorii pentru anioni organici și transportorii pentru compuși monocarboxilați. Odată intrați în celule, hormonii tiroidieni sunt transportați în nucleu prin difuziune și cu ajutorul unor proteine de legare citosolică.

Receptorii pentru hormonii tiroidieni (TR) fac parte din superfamilia receptorilor nucleari, care mai include receptorii pentru hormoni steroizi, calcitriol (forma activă a vitaminei D₃), acidul retinoic și receptorii orfani (ai căror liganzi nu sunt cunoscuți). Există două izoforme ale receptorului tiroidian, codificate de gene diferite: TR α , codificat de o genă localizată pe cromosomul 17 și TR β , codificat de o genă situată pe cromosomul 3. Ambele izoforme leagă hormonii tiroidieni cu afinitate mare (constanta de disociere este cuprinsă între 10⁻⁹-10⁻¹⁰ M).

TR conțin mai multe domenii funcționale, care sunt similare celor existente la toți receptorii hormonalni nucleari: un domeniu amino-terminal A/B, un domeniu central de legare la ADN, o regiune balama și un domeniu carboxi-terminal de legare a ligandului (Figura 20.4A).

Domeniul de legare la ADN (DBD – DNA binding domain) conține două "degete de zinc", ce reprezintă bucle formate de lanțul polipeptidic ca urmare a coordinării a patru resturi de cisteină cu un atom de zinc. În primul deget de zinc există "cutia P" (*P-box*), care are o importanță esențială pentru recunoașterea unor secvențe specifice din ADN, numite elemente de răspuns la hormoni (HRE – *hormone response element*; în cazul hormonilor tiroidieni acestea se numesc TRE – *thyroid response element*).

Regiunea balama se găsește între domeniile DBD și LBD și conține o secvență care reprezintă semnalul de localizare nucleară a receptorului.

Domeniul de legare a ligandului (LBD – ligand binding domain) are rolul de a lega hormonul tiroidian; în acest scop, el suferă o modificare conformațională, cu formarea unui buzunar hidrofob pentru ligand.

La extremitatea carboxi-terminală a receptorului tiroidian se găsește domeniul AF-2 (*activation function-2*), important pentru interacțiunea cu proteine specifice cu rol de coactivatori ai transcripției.

TR se leagă la secvențele TRE ca heterodimeri cu receptorul pentru acidul retinoic/retinoizi (RXR). Procesul de dimerizare este favorizat de unele secvențe specifice localizate atât în cadrul domeniului DBD, cât și al domeniului LBD. Majoritatea TRE sunt localizate în amonte față de promotorii genelor țintă ai hormonilor tiroidieni, dar în unele cazuri sunt situate în aval față de regiunea codantă. Regiunile TRE conțin o secvență consens formată din șase nucleotide (G/A)GGT(C/G)A, aflată în două copii pentru a putea lega receptorii dimerizați.

TR se pot lega la TRE și atunci când sunt neocupați de ligand; în acest caz au efect represor asupra transcripției genelor țintă, această acțiune realizându-se prin intermediul unor proteine cu rol de *corepresor* ce se asociază cu TR la nivelul unor secvențe din domeniul LBD. Un exemplu de corepresor este NCoR (nuclear receptor corepresor).

Legarea hormonului tiroidian la TR determină disocierea corepresorilor și asocierea altor proteine cu rol de *coactivator*, la nivelul regiunii AF-2 precum și al domeniului LBD. O asemenea proteină este SRC-1 (steroid receptor coactivator-1). Prin intermediul coactivatorilor, complexe TR-T₃ interacționează cu factorii generali de transcripție, facilitând asamblarea complexului de inițiere a transcripției (ce conține ARN polimeraza II și factorii generali de transcripție) și determinând, astfel, începerea procesului de transcripție a genelor țintă (Figura 20.4B).

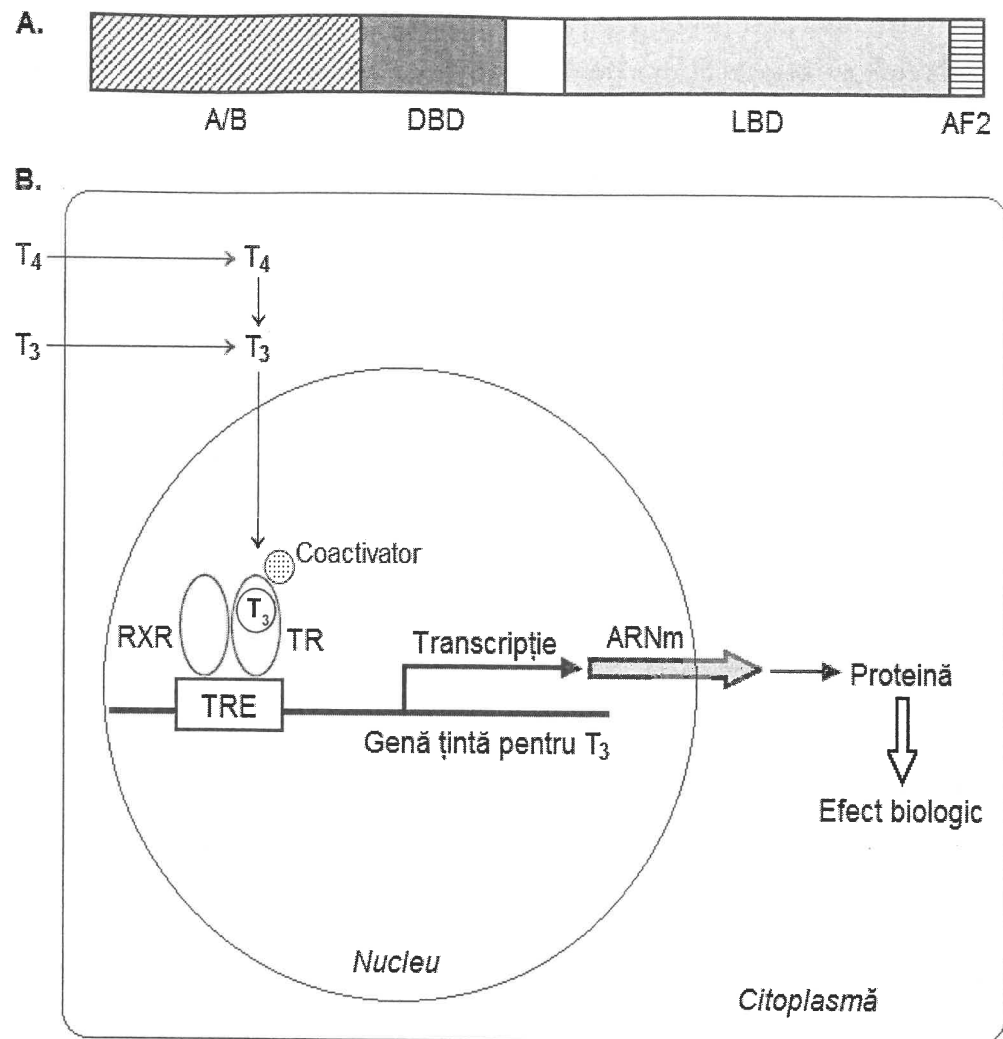


Figura 20.4 Structura receptorului pentru hormonii tiroidieni (A) și mecanismul de acțiune al acestora (B). DBD, domeniu de legare la ADN; LBD, domeniu de legare a ligandului; TR, receptor pentru hormoni tiroidieni; RXR, receptor pentru retinoizi; TRE, element de răspuns la hormoni tiroidieni.

20.6 TULBURĂRI ALE FUNCȚIEI TIROIDIENE

Tulburările funcției tiroidiene se pot caracteriza atât prin producerea excesivă de hormoni tiroidieni (hipertiroidism) cât și prin producerea insuficientă a acestora (hipotiroidism). Ambele tipuri de tulburări pot fi clasificate ca *primare* (atunci când procesul patologic își are originea la nivelul glandei tiroide) sau *secundare* (în cazul în care anomalia tiroidiană este consecința unei disfuncții la nivel hipofizar sau hipotalamic). Bolile tiroidiene sunt comune, afectând aproximativ 3% din populație; raportul dintre femeile și bărbații afectați este de 10:1. Mai mult de 95% din bolile tiroidiene își au originea la nivelul glandei tiroide (au caracter primar) și mare parte din ele sunt de origine autoimună.

20.6.1 HIPOTIROIDISMUL

Hipotiroidismul este definit ca incapacitatea glandei tiroide de a produce cantități suficiente de hormoni tiroidieni, pentru a satisface necesitățile tisulare. Hipotiroidismul este cauzat în

mod obișnuit de boli sau tratamente care distrug țesutul tiroidian sau interferează cu biosinteza hormonilor tiroidieni (hipotiroidismul *primar*), și mai rar de tulburări ale adenohipofizei sau hipotalamusului (hipotiroidism *secundar*). Hipotiroidismul este mai frecvent la femei față de bărbați și incidența crește odată cu vârsta la ambele sexe, fiind de aproximativ 6% la persoanele peste 60 de ani. Principalele cauze de hipotiroidism sunt prezentate în tabelul 20.1.

Tiroidita Hashimoto este cea mai frecventă cauză de hipotiroidism în regiunile în care aportul de iod este suficient. Este o tiroidită cronică de natură autoimună, în care are loc distrucția progresivă a țesutului tiroidian. Mai mult de 90% dintre pacienți au autoanticorpi anti-tiroidieni: *anti-tiroglobulină* și *anti-tiroperoxidază*. Boala evoluează de obicei cu atrofie tiroidiană, dar se poate prezenta și cu tiroidă de dimensiuni normale sau chiar gușă datorită procesului inflamator. Tiroidita Hashimoto poate coexista cu alte boli autoimune.

La nivel mondial, **deficitul de iod** este cauza cea mai comună de hipotiroidism asociat cu **gușă**. Mărirea de volum a glandei tiroide apare ca un mecanism compensator la reducerea producției de hormoni tiroidieni și este cauzată de stimularea excesivă cu TSH, care determină hiperplazia celulelor foliculare tiroidiene.

Excesul de iod poate cauza hipotiroidism prin inhibarea organificării iodului și, în consecință, a sintezei de T_4 și T_3 . Sunt afectați indivizii cu anomalii la nivelul glandei tiroide, cum sunt tiroidita (Hashimoto sau alte tipuri), tiroidectomia parțială sau terapia cu iod radioactiv. Aportul excesiv de iod poate proveni din suplimentele de iod, medicamente ce conțin iod (cum este amiodarona) sau substanțe de contrast utilizate în explorări radiologice.

Formele iatrogene de hipotiroidism apar după intervenții chirurgicale pe tiroidă, terapie cu iod radioactiv, iradierea zonei gâtului sau administrarea de medicamente pentru tratarea hipertiroidismului (propiltiouracil, carbimazol, metimazol) în doze excesive. Alte medicamente care pot cauza hipotiroidism sunt:

- *litiul* – inhibă cuplarea resturilor iodotirozil pentru a forma T_4 și T_3 și inhibă secreția hormonilor tiroidieni; tratamentul cu litiu poate cauza hipotiroidism la 20-30 % din cazuri, de obicei hipotiroidism subclinic, dar uneori hipotiroidism manifest clinic;
- *interferonul α* – poate cauza tiroidită la 1-5% dintre pacienți, cu dezvoltare posibilă a tirotoxicozei, iar ulterior a hipotiroidismului;
- *amiodarona* – este un antiaritmie care conține 35% iod și poate cauza atât hipotiroidism (datorită acțiunii anti-tiroidiene a iodului), cât și hipertiroidism (ca urmare a producerii tiroiditei); amiodarona inhibă și conversia periferică a T_4 în T_3 ;
- *inhibitori de tirozin kinază* – medicamentul sunitinib, utilizat în terapia cancerului, a fost asociat cu hipotiroidism la 15-40% dintre pacienți.

Hipotiroidismul tranzitoriu poate apărea în diverse forme de tiroidită cum sunt tiroidita postpartum, tiroidita subacută, tiroidita sporadică nedureroasă. În aceste cazuri, hipotiroidismul urmează, de obicei, unei faze prealabile de tirotoxicoză.

Hipotiroidismul congenital are o incidență de aproximativ 1:2000-1:4000 nou născuți și reprezintă cea mai comună cauză tratabilă de retard mental. El poate fi permanent sau tranzitoriu. Hipotiroidismul congenital *permanent* poate fi cauzat de agenezia sau disgenezia tiroidiană (85% din cazuri) sau de erori înnăscute în biosinteza hormonilor tiroidieni (15%

din cazuri). Hipotiroidismul congenital *tranzitoriu* apare, de obicei, la nou născuți prematuri în zone cu deficiență endemică de iod. Întrucât hormonii tiroidieni sunt necesari pentru dezvoltarea neurologică, hipotiroidismul congenital netratat duce la scăderea profundă a creșterii (nanism) și a dezvoltării mentale, motiv pentru care afecțiunea a fost denumită și *cretinism*. Se recomandă screening-ul neonatal pentru hipotiroidismul congenital prin dozarea fT_4 și/sau a TSH, pentru a permite începerea terapiei de substituție înainte de instalarea leziunilor neurologice ireversibile.

Hipotiroidismul subclinic (compensat) se caracterizează prin existența unui nivel seric crescut de TSH, cu concentrații normale de hormoni tiroidieni. Cauzele acestei forme de hipotiroidism sunt aceleași cu cele care determină hipotiroidismul clinic manifest. Majoritatea pacienților sunt asimptomatici, iar unii dintre ei pot prezenta simptome nespecifice de hipotiroidism sau anticorpi anti-tiroperoxidază sau anti-tiroglobulină. Evoluția spre hipotiroidism clinic manifest apare cu o frecvență de 2-5% pe an.

Hipotiroidismul secundar apare ca rezultat al afecțiunilor hipofizare sau hipotalamice caracterizate printr-un deficit de TSH, TRH sau ambele. Aceste cauze de hipotiroidism sunt rare, reprezentând mai puțin de 1% din totalitatea cazurilor de hipotiroidism. Pacienții cu hipotiroidism secundar prezintă, de obicei, și alte deficiențe hormonale hipofizare (panhipopituitarism).

Rezistența la hormoni tiroidieni se caracterizează prin reducerea răspunsului țesuturilor țintă la acțiunea T_3 și T_4 . Este o condiție moștenită, cauzată de mutații în genele care codifică receptorii pentru hormonii tiroidieni și care duc la scăderea afinității acestora pentru T_3 . Unii pacienți pot fi eutiroidieni, dar alții manifestă simptome de hipotiroidism.

Tabelul 20.1 Principalele cauze de hipotiroidism

Hipotiroidism primar	
	Boli tiroidiene autoimune
	Tiroidita Hashimoto
	Deficit de iod
	Exces de iod
	Diverse forme de tiroidită tranzitorie: postpartum, subacută, nedureroasă
	Iatrogenic
	Post-tiroidectomie
	După tratament cu iod radioactiv
	Iradieria zonei gâtului
	Traumatisme în zona gâtului
	Medicamente: anti-tiroidiene, litiu, interferon- α , amiodarona, sunitinib
	Boli infiltrative ale tiroidei: hemocromatoză, sarcoidoză, amiloidoză, fibroză (tiroidita Riedel)
	Hipotiroidism congenital
	Agenezia sau disgenezia tiroidiană
	Defecte genetice în sinteza hormonilor tiroidieni
Hipotiroidism secundar	
	Boli hipofizare cu deficit de TSH
	Boli hipotalamice cu deficit de TRH

Manifestări clinice în hipotiroidism. Hipotiroidismul se poate dezvolta, uneori, insidios și în stadiile timpurii simptomele pot fi discrete. Manifestările clinice din hipotiroidism sunt asociate cu o reducere generalizată a metabolismului și pot fi grupate în trei categorii. Astfel, semnele și simptomele generate de *tulburările metabolice* sunt intoleranță la frig, uscăciune și paloare tegumentară, subțierea sau căderea părului, stare de slăbiciune, oboseală sau chiar letargie, creștere în greutate, constipație, slăbiciunea mușchilor proximali, edem facial și periorbital, neregularități menstruale și infertilitate la femei. Semnele *cardiovasculare* includ bradicardie, scăderea tensiunii arteriale, modificări EKG (voltaj scăzut și aplatizarea undei T), insuficiență cardiacă, fibrilație atrială. Simptomele legate de afectarea *sistemului nervos central* sunt reprezentate de apatie, deficit de concentrare și de memorie, depresie. Pacienții cu hipotiroidism sever pot prezenta revărsat pleural și pericardic, megacolon, instabilitate hemodinamică, comă.

Termenul de *mixedem* este utilizat frecvent pentru a descrie întregul sindrom clinic al hipotiroidismului, dar se referă în mod strict la modificările cutanate caracteristice hipotiroidismului sever: tegumente uscate, îngroșate și infiltrate, edem subcutanat (datorat acumulării de mucopolizaharide în țesutul celular subcutanat). Infiltrația edematoasă este prezentă în special la nivel facial, determinând modificarea trăsăturilor faciale, dar poate afecta și zona gâtului, membrele și abdomenul.

Diagnostic de laborator. Pacienții cu hipotiroidism manifest clinic au valori serice scăzute ale hormonilor tiroidieni: T_4 este întotdeauna scăzut, dar T_3 poate fi normal în formele moderate de hipotiroidism. Nivelul seric al TSH este crescut în hipotiroidismul primar și scăzut sau normal în hipotiroidismul secundar. Hipotiroidismul subclinic se caracterizează printr-un nivel crescut al TSH asociat cu un nivel normal al hormonilor tiroidieni.

La pacienții cu tiroidită cronică autoimună (Hashimoto) sunt prezenți *autoanticorpii anti-tiroidieni*: anti-tiroperoxidază (mai frecvent) și anti-tiroglobulină. Aproximativ 10% din indivizii din populația generală sunt pozitivi pentru anticorpii anti-tiroperoxidază, mulți dintre ei neavând afecțiuni tiroidiene; unii dintre ei vor dezvolta hipotiroidism mai târziu în cursul vieții.

Modificările biochimice din hipotiroidism includ: creșterea colesterolului total și a LDL-colesterolului (ca urmare a scăderii clearance-ului LDL), creșterea activității serice a creatin kinazei (datorită unei posibile miopatii), hiponatremie (în hipotiroidismul sever, ca urmare a unei eliberări crescute de hormon antidiuretic, cu retenție excesivă de apă).

Tratamentul hipotiroidismului constă în terapie de substituție cu hormoni tiroidieni. Cel mai frecvent se folosește levotiroxina (T_4), administrată zilnic pe cale orală. Aceasta este transformată în periferie în T_3 prin deiodinare. Terapia poate fi monitorizată în laborator prin măsurarea nivelului seric al TSH și, dacă acesta este anormal, măsurarea fT_4 seric.

20.6.2 HIPERTIROIDISMUL

Hipertiroidismul este o condiție clinică ce se caracterizează prin sinteza crescută de hormoni tiroidieni de către o glandă tiroidă hiperactivă, cu un nivel crescut de hormoni tiroidieni în circulație. Termenul de *tirotoxicoză* este utilizat, de asemenea, pentru a descrie această

condiție, dar are un sens mai larg referindu-se la orice situație caracterizată printr-un exces de hormoni tiroidieni în sânge, inclusiv în cazul aportului de tiroxină exogenă. Hipertiroidismul afectează aproximativ 2% dintre femei și 0,2% dintre bărbați. Hipertiroidismul poate fi *primar*, cauzat de o patologie la nivelul glandei tiroide, sau *secundar* unei tulburări la nivelul adenohipofizei. Principalele cauze ale hipertiroidismului sunt prezentate în tabelul 20.II.

Boala Graves este cea mai frecventă cauză de hipertiroidism, reprezentând 60-80% din totalitatea cazurilor. Are o prevalență semnificativ mai mare la femei comparativ cu bărbații și apare, de obicei, la vârste cuprinse între 30 și 50 de ani, predispoziția genetică având un rol important în apariția bolii. Boala Graves este o afecțiune autoimună caracterizată prin prezența imunoglobulinelor G de stimulare a tiroidei (*TSI*) care se leagă la receptorul pentru TSH din membrana celulelor tiroidiene și realizează o stimulare continuă a acestuia, ducând la sinteza și secreția excesivă de hormoni tiroidieni. Istoricul familial indică o predispoziție pentru boli autoimune, iar o mare parte dintre pacienți prezintă și anticorpi anti-tiroperoxidază și anti-tiroglobulină.

În boala Graves există o mărire de volum difuză, simetrică și nedureroasă a glandei tiroide (gușă), ca urmare a stimulării dezvoltării acesteia de către TSI. Pe lângă prezența semnelor și simptomelor caracteristice hipertiroidismului, boala Graves se complică, în aproximativ 30% din cazuri, cu *oftalmopatie*, caracterizată prin protruzia globilor oculari cu tumefierea și inflamarea țesuturilor moi retroorbitare (exoftalmie), precum și modificări inflamatorii în mușchii oculari ducând la disfuncția acestora.

Nodulii tiroidieni sunt tumori benigne (în majoritatea cazurilor) la nivelul glandei tiroide, fiind relativ frecvenți în populație; incidența lor crește odată cu vârsta și poate ajunge până la 5% dintre adulți. Unii pacienți prezintă un nodul solitar (*adenom toxic*), în timp ce alții au noduli multipli (*gușa toxică multinodulară* sau boala Plummer). Nodulii tiroidieni pot fi asociați cu eutiroidismul, dar uneori ei ajung să secrete hormoni tiroidieni în exces, în mod autonom, ducând la apariția tirotoxicozei. Cantitățile crescute de hormoni tiroidieni eliberați în sânge supresează secreția de TSH și inhibă funcția endocrină a țesutului tiroidian normal. La acești pacienți lipsesc oftalmopatia și alte stigmatе ale bolii Graves (cum sunt autoanticorpii anti-tiroidieni). Cauza nodulilor hiperactivi nu este cunoscută, dar se crede că nu este de natură imunologică. Nodulii tiroidieni de natură malignă reprezintă o cauză foarte rară de hipertiroidism.

Tiroidita este un termen general care descrie inflamația țesutului tiroidian. Toate formele de tiroidită pot cauza o tirotoxicoză tranzitorie (cu durată de 6-8 săptămâni), ca urmare a eliberării de cantități mari de hormoni tiroidieni de la nivelul foliculilor tiroidieni ce prezintă leziuni inflamatorii. Excesul de hormoni tiroidieni din circulație supresează secreția de TSH, ceea ce duce la scăderea sintezei de noi cantități de hormoni tiroidieni. Ca urmare, pe măsură ce glanda este deplețiată de hormoni tiroidieni, se instalează progresiv hipotiroidismul, aceasta fiind a doua fază în evoluția tiroiditelor, cu o durată de 2-4 luni. În cele din urmă, funcția tiroidiană revine la normal la majoritatea pacienților. Există mai multe forme de tiroidită. Unele sunt de natură autoimună și nedureroase, de exemplu *tiroidita sporadică*

nedureroasă și tiroidita postpartum. Aceasta din urmă apare la 5-7% dintre femeile care au născut, funcția tiroidiană revenind la normal în decurs de 12-18 luni la 80% dintre paciente. Alte forme de tiroidită sunt *tiroidita subacută dureroasă*, o afecțiune inflamatorie de etiologie virală cu evoluție autolimitantă, tiroidita cauzată de iradierea glandei tiroide și cea indusă de medicamente.

Alte cauze de hipertiroidism sunt reprezentate de *administrarea de hormoni tiroidieni în exces*, fie de către medic în cadrul terapiei de substituție (hipertiroidism iatrogenic), fie intențional de către pacientul însuși (tirotoxicoza factitia).

Aportul excesiv de iod, prin dietă sau substanțe de radiocontrast ce conțin iod, poate cauza hipertiroidism, în special la unii pacienți cu boală Graves sau gușă multinodulară nemanifeste (sindromul Jod-Basedow).

Tumorile de origine trofoblastică producătoare de hCG pot duce la apariția hipertiroidismului, datorită acțiunii slabe TSH-like a gonadotropinei corionice.

Hipertiroidismul subclinic se caracterizează printr-un nivel scăzut al TSH și concentrații normale de hormoni tiroidieni, cu absența simptomelor de hipertiroidism. Cauzele sunt aceleași care stau la baza hipertiroidismului manifest clinic, în special nodulii tiroidieni. Importanța clinică a hipertiroidismului subclinic este legată de efectele sale asupra sistemului cardiovascular și anume o rată crescută a fibrilației atriale; de asemenea, se poate asocia cu scăderea densității minerale osoase. Evoluția spre hipertiroidism clinic manifest are loc cu o frecvență de 1-4% pe an.

Hipertiroidismul secundar este rar întâlnit și se datorează stimulării excesive a glandei tiroide de către TSH, produs în cantități crescute la nivelul unui adenom hipofizar.

Tabelul 20.II Principalele cauze de hipertiroidism

Hipertiroidism primar	
Boli tiroidiene autoimune	
Boala Graves	
Noduli tiroidieni cu secreție autonomă	
Gușa toxică multinodulară (boala Plummer)	
Adenom toxic	
Tiroidite	
Autoimune: postpartum, tiroidita sporadică nedureroasă	
Infecțioase: tiroidita subacută dureroasă	
Cauzată de iradierea tiroidei	
Indusă de medicamente: amiodaronă, interferon- α	
Aport exogen de hormoni tiroidieni	
Terapie de substituție în exces (hipertiroidism iatrogenic)	
Aport excesiv intențional de hormoni tiroidieni (tirotoxicoza factitia)	
Aport excesiv de iod (sindromul Jod-Basedow)	
Tumori de origine trofoblastică producătoare de hCG	
Hipertiroidism secundar	
Adenom hipofizar hipersecretant de TSH	

Manifestări clinice în hipertiroidism. Semnele clinice sunt asociate cu o creștere generalizată a metabolismului și pot fi grupate în trei categorii. Cele determinate de *tulburările metabolice* sunt intoleranță la căldură, transpirații, tegumente calde și umede, scădere în greutate, creșterea apetitului, slăbiciune musculară, exoftalmie și mobilitate redusă a pleoapelor superioare. Semnele *cardiovasculare* includ palpitații, tahicardie, fibrilație atrială, creșterea presiunii arteriale sistolice și scăderea celei diastolice, puls arterial hiperdinamic. Simptomele legate de afectarea *sistemului nervos central* constau în nervozitate, agitație și hipermotilitate, insomnie, tremurături, labilitate emoțională, oboseală, reflexe exagerate. Alte manifestări care apar la femei sunt neregularități menstruale sau oligomenoree, osteoporoză.

Foarte rar, pacienții cu tirotoxicoză pot dezvolta *criza (furtuna) tiroidiană*, o urgență medicală manifestată prin hiperpirexie, deshidratare, insuficiență cardiacă și, posibil, comă.

Diagnostic de laborator. Modificările de laborator din hipertiroidismul manifest clinic constau în existența unor valori serice crescute ale T_3 și T_4 și valori scăzute ale TSH (uneori supresie totală), datorită efectului de feedback negativ exercitat de nivelurile crescute de hormoni tiroidieni asupra axului hipotalamo-hipofizar. În cazurile rare de hipertiroidism secundar, pacienții prezintă valori crescute atât ale TSH seric, cât și ale hormonilor tiroidieni. Un nivel scăzut persistent al TSH asociat cu concentrații normale de hormoni tiroidieni sunt relevante pentru hipertiroidismul subclinic.

La pacienții cu hipertiroidism de natură autoimună, anticorpii anti-tiroidieni (TSI, anti-tiroperoxidază, anti-tiroglobulină) sunt adesea pozitivi. Un nivel crescut al TSI confirmă diagnosticul de boală Graves.

În hipertiroidism pot fi prezente și unele *modificări biochimice*: hipercalcemie (în tirotoxicoza severă, datorită unui turnover accelerat al țesutului osos), hipocolesterolemie (ca urmare a creșterii clearance-ului LDL), hipokaliemie (asociată cu fenomene de paralizie tirotoxică).

Tratamentul hipertiroidismului. Tirotoxicoza poate fi tratată în trei moduri: cu medicamente antitiroidiene, cu iod radioactiv și chirurgical (tiroidectomie subtotală). *Medicamentele antitiroidiene* sunt din clasa tionamidelor (conțin o grupare de tiouree în cadrul unei structuri heterociclice): propiltiouracil, metimazol și carbimazol. Acestea reduc sinteza de hormoni tiroidieni prin inhibarea iodinării resturilor de tirozină din tiroglobulină, mediată de tiroperoxidază. Concentrațiile mari de propiltiouracil au ca efect și scăderea conversiei periferice a T_4 în T_3 activ. Tionamidele pot scădea, de asemenea, concentrațiile serice de TSI la pacienții cu boală Graves, prin efectul lor imunosupresor. După începerea terapiei pentru hipertiroidism, evoluția bolii poate fi monitorizată inițial prin măsurarea fT_4 sau/și a fT_3 și doar ulterior prin măsurarea TSH, deoarece normalizarea nivelului TSH are loc abia după mai multe săptămâni. Ca terapie adjuvantă se pot administra medicamente *β -blocante*, care îndepărtează simptome precum tahicardia, tremurăturile și anxietatea, având și efect de reducere a transformării T_4 în T_3 .

Terapia cu *iod radioactiv* este eficientă la pacienții cu hipertiroidism datorat bolii Graves sau gușei nodulare toxice: 80% dintre ei vor deveni eutiroidieni în aproximativ două luni după administrarea unei doze unice de iod radioactiv. Restul vor necesita una sau mai multe doze

adiționale. *Tiroidectomia* are efect curativ în 90% din cazurile de hipertiroidism. De asemenea, elimină simptomele compresive asociate cu gușa toxică multinodulară de dimensiuni mari.

20.7 TESTE DE LABORATOR PENTRU EVALUAREA FUNCȚIEI TIROIDIENE

Afecțiunile tiroidiene se manifestă, adesea, prin semne și simptome clinice discrete și ne-specifice, motiv pentru care testele de evaluare a funcției tiroidiene sunt instrumente importante de diagnostic.

20.7.1 MĂSURAREA NIVELULUI SERIC AL TSH

Întrucât majoritatea afecțiunilor tiroidiene au caracter primar, iar eliberarea TSH din adenohipofiză este controlată prin feedback negativ de către hormonii tiroidieni, nivelul seric al TSH reprezintă un bun indicator al funcției tiroidiene. Ca urmare, măsurarea concentrației serice a TSH este recomandată ca test de primă linie pentru evaluarea funcției tiroidiene. Tehnicile utilizate sunt cele imunochimice (ELISA, chemiluminiscență, electrochemiluminiscență).

Dacă se suspectează o boală tiroidiană primară și concentrația TSH este normală, se poate conchide că pacientul este eutiroidian. În *hipotiroidismul* manifest clinic, nivelurile TSH sunt crescute marcat, frecvent de peste 10 ori față de limita superioară a normalului. Creșteri mai puțin marcate sunt observate în situații de graniță, dar măsurarea TSH este mai sensibilă decât a fT_4 în aceste circumstanțe. Hipotiroidismul secundar, cauzat de afecțiuni hipofizare sau hipotalamice, se însoțește de valori scăzute sau normale ale TSH.

În *hipertiroidism*, nivelurile plasmatiche ale TSH sunt scăzute sau chiar nedetectabile. Valori scăzute pot apărea, de asemenea, la indivizi cu hipertiroidism subclinic, situație în care hormonii tiroidieni au valori normale. În hipertiroidismul secundar, valoarea TSH seric este crescută.

20.7.2 MĂSURAREA CONCENTRAȚIEI SERICE A HORMONILOR TIROIDIENI

T_4 total și T_3 total

Măsurarea nivelului seric total al T_4 (tT_4) și T_3 (tT_3) are o valoare limitată deoarece rezultatele sunt influențate de concentrația proteinelor de legare a hormonilor tiroidieni. Astfel, creșterea nivelului plasmatic sau a afinității de legare a TBG duce la creșterea concentrației hormonilor tiroidieni totali, în timp ce scăderea nivelului sau afinității TBG are ca efect reducerea valorii tT_4 și tT_3 ; în ambele situații, concentrația hormonilor tiroidieni liberi rămâne neschimbată. Ca urmare, niveluri serice ușor crescute sau scăzute ale hormonilor tiroidieni totali pot exista și la indivizii eutiroidieni.

Creșterea concentrației TBG poate apărea în diverse situații, în special în cursul sarcinii, al terapiei cu estrogeni sau al administrării de contraceptive orale (datorită efectelor estrogenilor de stimulare a sintezei TBG), în hepatita acută și în cazul tratamentului cu clofibrat. Scăderea nivelului TBG poate fi cauzat de anomalii genetice, ciroza hepatică, boli cronice severe, sindrom nefrotic, malnutriție, malabsorbție, exces de androgeni, exces de glucocorticoizi (sindrom Cushing, administrare farmacologică).

Actualmente, măsurarea tT_4 și a tT_3 pentru diagnosticul tulburărilor tiroidiene este rareori recomandată întrucât poate da informații înșelătoare, preferându-se dozarea fracțiunilor libere ale hormonilor tiroidieni.

T_4 liber (fT_4 sau free T_4) și T_3 liber (fT_3)

Concentrația hormonilor tiroidieni liberi, care reprezintă fracțiunea biologic activă, reflectă mult mai corect statusul tiroidian în comparație cu nivelul hormonilor totali. Ea poate fi măsurată indirect sau direct. Estimarea *indirectă* constă în măsurarea nivelului hormonului tiroidian total și a concentrației proteinelor de legare, urmată de calcularea *indexului hormonului tiroidian liber*. Măsurarea *directă* a concentrației hormonilor tiroidieni liberi se practică în mod curent în laboratoarele clinice, prin tehnici imunochimice.

fT_4 are valori scăzute în *hipotiroidism*, astfel încât acest test are valoare diagnostică. fT_3 , însă, poate fi normal în hipotiroidismul moderat datorită unei conversii crescute a T_4 în T_3 în periferie, astfel încât măsurarea sa nu are valoare pentru diagnosticul acestei afecțiuni.

În *hipertiroidism*, atât fT_4 cât și fT_3 sunt crescute de obicei. Decelarea unui nivel scăzut al TSH asociat cu un nivel crescut al fT_4 este suficient pentru diagnosticul de hipertiroidism. La unii pacienți, TSH este scăzut dar fT_4 este în interiorul intervalului de referință; în acest caz se recomandă măsurarea fT_3 , întrucât nivelul seric al T_3 este crescut, adesea, într-o măsură mai mare decât al T_4 în multe forme de hipertiroidism. Așadar, fT_3 reprezintă un test sensibil pentru diagnosticul hipertiroidismului. Existența unui nivel crescut al fT_3 asociat cu un nivel normal al fT_4 este cunoscută ca "toxicoza T_3 ".

Tabelul 20.III prezintă modul cum variază valorile TSH, fT_4 și fT_3 în diferite stări patologice.

Tabelul 20.III Modificările testelor funcției tiroidiene în diverse situații clinice

Entitate clinică	TSH seric	fT_4 seric	fT_3 seric
Hipertiroidism			
Primar	↓	↑	↑
Toxicoza T_3	↓	N	↑
Subclinic	↓	N	N
Secundar	↑	↑	↑
Hipotiroidism			
Primar	↑	↓	↓ / N
Subclinic	↑	N	N
Secundar	↓ / N	↓	↓ / N
Eutiroidism			
Sindromul eutiroidianului bolnav	N / ↑ / ↓	N / ↓	↓

20.7.3 TESTUL DE STIMULARE CU TRH

Acest test a fost utilizat înainte de anii 1980, când tehnicile de măsurare a TSH seric nu puteau detecta valori aflate sub limita inferioară a intervalului de referință, în special pentru a confirma diagnosticul de hipotiroidism secundar. În acest test, nivelul plasmatic al TSH este

măsurat imediat înainte și la 20 și 60 de minute după administrarea de TRH intravenos. Răspunsul normal constă într-o creștere a concentrației TSH cu cel puțin 2 mUI/l la 20 de minute, cu revenirea la valoarea bazală la 60 de minute.

Măsurarea răspunsului TSH la TRH nu oferă informații suplimentare față de cele oferite de o dozare a nivelului bazal al TSH. Testul TRH poate avea utilitate pentru investigarea pacienților cu boli hipofizare sau hipotalamice, pentru a evalua capacitatea adenohipofizei de a secreta TSH.

20.7.4 AUTOANTICORPI

Variați autoanticorpi împotriva unor antigene din țesutul tiroidian pot fi detectați în serul pacienților cu boli tiroidiene. Astfel, în boala Graves se detectează imunoglobulinele care stimulează receptorul TSH (TSI). La pacienții cu tiroidită autoimună (în mod particular tiroidita Hashimoto) sunt prezenți autoanticorpi *anti-tiroperoxidază* și *anti-tiroglobulină*, dar probabil că acești anticorpi nu sunt patogenici. Măsurarea autoanticorpilor tiroidieni poate fi utilă la pacienții la care testele biochimice ale funcției tiroidiene sunt echivoce, întrucât prezența lor în titru mare este sugestivă pentru bolile tiroidiene. Totuși, ea nu are valoare diagnostică, întrucât acești autoanticorpi (în special cei anti-tiroperoxidază și anti-tiroglobulină) pot fi prezenți și la unii indivizi care nu prezintă disfuncții tiroidiene (într-o proporție de până la 10%). La pacienții cu tumori maligne tiroidiene, care secretă tiroglobulină, titrul anticorpilor anti-tiroglobulină poate crește progresiv și acesta constituie un instrument util pentru detectarea recurențelor.

20.7.5 TIROGLOBULINA

Măsurarea concentrației serice a tiroglobulinei este un test important pentru investigarea pacienților cu tumori maligne ale tiroidei. După tiroidectomie, nivelul tiroglobulinei scade la valori nedectabile. Reapariția tiroglobulinei în sânge este foarte sugestivă pentru recurența tumorii.

20.7.6 ALTE TESTE PENTRU FUNCȚIA TIROIDIANĂ

Pentru investigarea afecțiunilor tiroidiene sunt utile, în anumite situații, unele tehnici care utilizează izotopi radioactivi. Acestea sunt de două tipuri. *Testul de captare a iodului radioactiv* (^{131}I) a fost folosit înainte de introducerea testelor specifice pentru hormonii tiroidieni, dar actualmente este puțin utilizat. Captarea iodului radioactiv este crescută în boala Graves, poate fi normală sau crescută la pacienții cu gușă toxică multinodulară și este foarte scăzută sau nedectabilă în tirotxicoza datorată administrării exogene de hormoni tiroidieni sau în faza tirotoxică a tiroiditei. *Scintigrafia tiroidiană* este o tehnică ce poate fi utilizată pentru a depista cauza hipertiroidismului. În această tehnică, se administrează o doză de izotop radioactiv (de obicei $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ pertechnețat), după care se determină distribuția sa în interiorul glandei tiroide cu ajutorul unei camere gama. Boala Graves se caracterizează prin captare crescută uniformă, difuză a radioizotopului, în timp ce în gușă toxică multinodulară există

arii focale de captare crescută (noduli "calzi"). În cazul nodulului solitar toxic, restul țesutului tiroidian arată captare absentă.

20.7.7 DIFICULTĂȚI ÎN INTERPRETAREA REZULTATELOR TESTELOR DE EVALUARE A FUNCȚIEI TIROIDIENE

Valori discordante ale TSH și fT_4 . În mod normal, concentrațiile TSH și fT_4 trebuie să fie invers relaționate, datorită reglării prin feedback a secreției TSH de către hormonii tiroidieni: creșterea unuia se asociază cu scăderea celuilalt și viceversa. Ocazional, în anumite circumstanțe, rezultate obținute pot fi discordante. Astfel, creșterea TSH neînsoțită de scăderea fT_4 poate apărea în: hipotiroidismul subclinic, modificarea recentă a dozajului hormonilor tiroidieni, administrarea anumitor medicamente, hipertiroidism secundar. Scăderea TSH neînsoțită de creșterea fT_4 poate fi întâlnită în: hipertiroidismul subclinic, tratament recent al tirotoxicozei, hipotiroidism secundar, boli nontiroidiene, unele medicamente.

Demn de remarcat este faptul că tehnicile imunochimice de dozare a TSH și a hormonilor tiroidieni sunt supuse interferențelor de către *anticorpi heterofili* ce apar în mod natural împotriva anticorpilor monoclonali utilizați în cadrul tehnicii. Asemenea interferențe apar rar, dar pot conduce la rezultate fals crescute și trebuie avute în vedere atunci când rezultatele de laborator obținute nu sunt în acord cu cele așteptate având în vedere condiția clinică a pacientului.

Concentrațiile hormonilor tiroidieni și ale TSH pot fi modificate la pacienți cu boli nontiroidiene, situație caracteristică așa-numitului "*sindrom al eutiroidianului bolnav*" (*sick euthyroid syndrome*). Asemenea boli sunt reprezentate de infecții, boli maligne, infarct miocardic, stare postchirurgicală, etc. Modificările constau în valori scăzute ale fT_3 și, mai rar, ale fT_4 , TSH-ul având valori normale, ușor crescute sau ușor scăzute. Aceste modificări sunt reversibile și nu se asociază cu simptome de hipo- sau hipertiroidism. Printre cauzele acestui sindrom se numără scăderea conversiei periferice a T_4 în T_3 , modificări în concentrația proteinelor de legare, creșterea concentrației plasmatice a acizilor grași liberi (care disociază hormonii tiroidieni de pe proteinele de legare), influențe non-tiroidiene exercitate asupra axului hipotalamo-hipofizo-tiroidian (de exemplu de către cortizol, care poate inhiba secreția TSH). Ca atare, testele de evaluare a funcției tiroidiene nu ar trebui efectuate în cursul unor boli non-tiroidiene, iar dacă această regulă nu se poate respecta, rezultatele anormale trebuie interpretate cu precauție.

Rezultatele testelor funcției tiroidiene pot fi influențate de o serie de *medicamente*:

- amiodarona, β -blocantele și unele substanțe de radiocontrast - inhibă conversia T_4 în T_3 și duc la creșterea fT_4 și tT_4 , asociată cu scăderea fT_3 și tT_3 ;
- carbamazepina și fenitoina - cresc conversia T_4 în T_3 , ducând la scăderea fT_4 și tT_4 ;
- estrogenii și fenotiazinele - cresc nivelul TBG, determinând creșterea tT_4 și tT_3 ;
- salicilații - intră în competiție cu T_4 și T_3 pentru legarea la TBG, ducând la scăderea tT_4 și tT_3 ;
- androgenii, glucocorticoizii - scad nivelul TBG și determină scăderea tT_4 și tT_3 ;

- litiul - inhibă cuplarea MIT și DIT, inhibă secreția T_4 și T_3 ; ca urmare, duce la scăderea fT_4 , tT_4 , fT_3 și tT_3 .

În tabelul 20.IV este prezentată o strategie pentru interpretarea rezultatelor principalelor două teste ale funcției tiroidiene (TSH și fT_4) efectuate în laboratorul clinic.

Tabelul 20.IV Protocol pentru testarea funcției tiroidiene și interpretarea rezultatelor

TSH normal		
$fT_4 \downarrow$	fT_4 normal	$fT_4 \uparrow$
sindromul eutiroidianului bolnav medicamente (carbamazepina, mală fenitoina)	funcție tiroidiană probabil nor-	anticorpi heterofili interferenți
TSH scăzut		
$fT_4 \downarrow$	fT_4 normal	$fT_4 \uparrow$
sindromul eutiroidianului bolnav hipotiroidism secundar	hipertiroidism subclinic sindromul eutiroidianului bolnav medicamente (glucocorticoizi) toxicoza T_3 (fT_3 seric \uparrow)	hipertiroidism primar medicamente (amiodarona) aport excesiv de iod mutații activatoare în receptorul TSH
TSH crescut		
$fT_4 \downarrow$	fT_4 normal	$fT_4 \uparrow$
hipotiroidism primar medicamente (litiu)	hipotiroidism subclinic terapie de substituție neadecvată pentru hipotiroidism sindromul eutiroidianului bolnav	rezistență la hormoni tiroidieni hipertiroidism secundar anticorpi heterofili interferenți

20.8 CAZURI CLINICE

20.8.1 CAZ CLINIC NR. 1

Pacientă în vârstă de 39 ani, se prezintă la medic pentru o examinare de rutină a stării de sănătate. Pacienta declară că manifestă o stare continuă de nervozitate și anxietate, precum și palpitații frecvente. Anamneza relevă că pacienta are un tranzit intestinal accelerat și că a pierdut în greutate. De asemenea, a observat o modificare în creșterea părului și unghiilor, precum și intoleranță la căldură. Pacienta a constatat, de asemenea, protruzia progresivă a globilor oculari. Neagă orice istoric de tulburare psihică (depresie sau anxietate) și nu ia nici o medicație.

Examenul fizic relevă o frecvență cardiacă de 110/minut, tensiunea arterială 150/80 mmHg, prezența unui tremor discret și accentuarea reflexelor la nivelul tuturor extremităților, tegumente calde, palme umede datorită unei secreții sudorale accentuate, exoftalmie. La nivelul glandei tiroide se constată o mărire de volum difuză, nedureroasă.

Investigații de laborator: TSH = 0,1 mUI/l (valori de referință 0,4-4,5 mUI/l), fT_4 = 68,8 pmol/l (valori de referință 10-23 pmol/l), fT_3 = 18,7 pmol/l (valori de referință 3,5-7 pmol/l), anticorpi anti-receptor pentru TSH (TSI) pozitivi.

Scintigrafia tiroidiană cu ^{99m}Tc -pertechnetat relevă o captare crescută în mod difuz la nivelul glandei tiroide.

Diagnostic: *hipertiroidism în contextul bolii Graves.*

Tratament: metimazol 15 mg/zi, în trei prize; compusul face parte din categoria medicamentelor anti-tiroidiene, care inhibă producția de hormoni tiroidieni.

20.8.2 CAZ CLINIC NR. 2

Pacientă în vârstă de 57 ani, se prezintă la spital acuzând o stare de oboseală permanentă. A observat, de asemenea, o constipație persistentă, în ciuda unui aport adecvat de fibre alimentare, precum și o creștere ușoară în greutate. Are frecvent senzația de frig atunci când temperatura ambiantă nu ar justifica acest lucru, pielea a devenit uscată și a observat o tumefiere în zona gâtului.

Examenul fizic relevă afebrilitate, frecvența cardiacă 60/minut. Reflexele sunt diminuate, iar tegumentul este uscat la palpare. Nu are nici o tulburare acută și pare a avea o stare de sănătate relativ bună. Palparea zonei gâtului relevă o tiroidă mărită de volum și nedureroasă.

Investigații de laborator: TSH = 54,6 mUI/l (valori de referință 0,4-4,5 mUI/l), $\text{fT}_4 = 5,7$ pmol/l (valori de referință 10-23 pmol/l), anticorpi anti-tiroperoxidază pozitivi.

Diagnostic: *hipotiroidism primar.*

Tratament: terapie de substituție cu levotiroxină 100 μg /zi, în priză unică.

Bibliografie selectivă

- Arneson W, Brickell J. Clinical Chemistry. A Laboratory Perspective. F. A. Davis Company; 2007.
- Baynes JW, Dominiczak MH. Medical Biochemistry. 2nd ed. Mosby Elsevier; 2005.
- Bhagavan NV. Medical biochemistry. 4th ed. Academic Press; 2002.
- Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. J Clin Invest. 2012; 122(9):3035-3043.
- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. W.B. Saunders Company; 1999.
- Choksi NY, Jahnke GD, St Hilaire C, Shelby M. Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health. Birth Defects Res (Part B). 2003; 68:479-491.
- Chung HR. Iodine and thyroid function. Ann Pediatr Endocrinol Metab. 2014; 19(1):8-12.
- Cooper DS. Antithyroid drugs. N Engl J Med. 2005; 352:905-917.
- Crook MA. Clinical Biochemistry and Metabolic Medicine. 8th ed. Hodder Arnold; 2012.
- Donangelo I, Braunstein GD. Update on subclinical hyperthyroidism. Am Fam Physician. 2011; 83(8):933-938.
- Friesema EC, Jansen J, Milici C, Visser TJ. Thyroid hormone transporters. Vitam Horm. 2005; 70:137-167.
- Gaitonde DY, Rowley KD, Sweeney LB. Hypothyroidism: an update. Am Fam Physician. 2012; 86(3):244-251.
- Gaw A, Cowan RA, O'Reilly DSJ, Stewart MJ, Shepherd J. Clinical Chemistry. 2nd ed. Churchill Livingstone; 1999.

14. Gurgul E, Sowinski J. Primary hyperthyroidism - diagnosis and treatment. Indications and contraindications for radioiodine therapy. *Nucl Med Rev Cent East Eur.* 2011; 14(1):29-32.
15. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology.* 11th ed. Elsevier Saunders; 2006.
16. Hiromatsu Y, Satoh H, Amino N. Hashimoto's thyroiditis: history and future outlook. *Hormones (Athens).* 2013; 12(1):12-18.
17. Kaplan LA, Pesce AJ. *Clinical Chemistry. Theory, analysis, correlation.* 5th ed. Mosby; 2010.
18. Karapanou O, Papadimitriou A. Thyroid hormone transporters in the human. *Hormones (Athens).* 2011; 10(4):270-279.
19. Marshall WJ, Bangert SK. *Clinical Chemistry.* 5th ed. Mosby; 2004.
20. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harper's Illustrated Biochemistry.* 28th ed. McGraw Hill; 2009.
21. Nussey SS, Whitehead SA. *Endocrinology. An integrated approach.* BIOS Scientific Publishers Limited; 2001.
22. Rastogi MV, LaFranchi SH. Congenital hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis.* 2010; 5:17.
23. Sharma M, Aronow WS, Patel L, Gandhi K, Desai H. Hyperthyroidism. *Med Sci Monit.* 2011; 17(4):RA85-91.
24. Simpser T, Rapaport R. Update on some aspects of neonatal thyroid disease. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2010; 2(3):95-99.
25. Smith CM, Marks AD, Lieberman MA. *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach.* 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
26. The Merck manual. Professional edition. <http://www.merckmanuals.com/professional/index.html>
27. Toy EC, Seifert WE, Strobel HW, Harms KP. *Case files. Biochemistry.* 2nd ed. McGraw Hill; 2008.
28. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001; 81(3):1097-1142.

21

Hormonii sexuali - aspecte biochimice, fiziologice, fiziopatologice

Didona Ungureanu, Raluca Stănescu

Funcțiile proprii gonadelor sunt deosebit de importante pentru reproducere și deci pentru perpetuarea speciei. Hormonii sexuali includ estrogenii, progesteronul și androgenii, hormoni cu rol în menținerea funcției de reproducere. Estrogenii și progesteronul reprezintă principalii hormoni sexuali produși de ovare, iar testosteronul este principalul hormon sexual testicular.

Hormonul eliberator de gondotropină, GnRH (gonadotropin-releasing hormone), descărcat în mod pulsatil de la nivelul hipotalamusului, determină, prin axa hipotalamo-hipofizară, eliberarea de hormon foliculo-stimulant FSH și hormon luteinizant LH din hipofiza anterioară. LH și FSH acționează asupra gonadelor, controlând gametogeneza (spermatogeneza și ovogeneza) și sinteza de hormoni sexuali steroizi. Hormonii sexuali, la rândul lor, exercită acțiuni inhibitorii la nivelul hipotalamusului și hipofizei, influențând secreția de GnRH, LH și FSH (mecanism de control de tip feedback negativ). Pe lângă rolul principal, de control al funcției reproductive, hormonii sexuali sunt implicați și în alte procese metabolice, sinteza lor având loc și la nivelul țesuturilor periferice.

21.1 FIZIOLOGIA REPRODUCTIVĂ FEMININĂ

Gonadele feminine (ovarele) au rol atât în maturarea și expulzia preovulului, cât și în sinteza și secreția hormonilor sexuali - estrogenii și progesteronul. Funcțiile ovarului sunt sub controlul axului hipotalamo-hipofizar.

În ovare, sinteza hormonilor feminini are loc la nivelul foliculului ovarian aflat în diferite stadii de evoluție. Componentele foliculului ovarian sunt celulele tecale, celulele granuloase și oocitul. Celulele tecale produc androgeni, iar celulele granuloase produc estrogeni. Celulele stromei ovariane, care sintetizează, de asemenea, androgeni sunt clasificate în celule interstițiale secundare (derivate din celulele tecale) și celule ale hilului. Aceste celule sunt responsabile de secreția hormonală ovariană postmenopauză.

La naștere, toți foliculii ovarieni conțin ovocite, iar numărul lor este de aproximativ două milioane. Ulterior acești foliculi primordiali involuează, astfel încât la pubertate numărul lor ajunge la 100.000-200.000, iar dintre aceștia în perioada fertilă doar 400-500 se vor matura. În această perioadă câte un folicul se maturizează în fiecare lună și eliberează preovulul. Maturizarea foliculului și eliberarea preovulului are loc la mijlocul ciclului menstrual, proces numit ovulație.

Ciclul menstrual este menținut prin acțiunea hormonilor sexuali feminini și a axului hipotalamo-hipofizar. Ciclul menstrual are o durată medie de 28 de zile și poate fi împărțit în trei faze: menstruală (primele 3-5 zile), foliculară (proliferativă) și luteală (secretorie) - ultimele 14 zile.

21.1.1 ROLUL AXULUI HIPOTALAMO-HIPOFIZAR

La nivel hipotalamo-hipofizar, în nucleii hipotalamusului mijlociu, se sintetizează GnRH - un polipeptid de 10 aminoacizi care este eliberat în sistemul venos port hipotalamo-hipofizar într-un ritm pulsatoriu. La nivelul celulelor gonadotrope din hipofiza anterioară se fixează pe un receptor membranar și inițiază sinteza și secreția gonadotropinelor printr-un mecanism dependent de inozitol 1,4,5-trifosfat și diacilglicerol (ca mesageri secundari). În ultimile zile ale fazei luteale și începutul fazei foliculare eliberarea pulsatilă lentă a GnRH - la fiecare 90 -120 minute - este responsabilă de stimularea sintezei și eliberării de FSH. Ca răspuns la concentrațiile crescânde de FSH, ovarul va secreta estradiol. Estradiolul va inhiba (prin feedback negativ) secreția de GnRH (prin neuroni care au ca mediator chimic acidul gamma-aminobutiric), dar se pare că are și acțiune directă inhibitorie pe celulele hipofizare. În faza foliculară, concentrațiile crescânde ale estradiolului determină un feedback pozitiv asupra hipotalamusului cu creșterea secreției pulsatorii a GnRH la fiecare 60 de minute ceea ce va determina creșterea secreției de LH. Sub acțiunea LH, ovarul va produce cantități suplimentare de estradiol (ipoteza "interacțiunii celor două celule", a se vedea steroidogeneza hormonilor feminini). Concentrațiile maxime de estradiol (preovulator, ziua a 13-14a) sunt responsabile de sensibilizarea hipofizei la acțiunea GnRH (creșterea numărului de receptori pentru GnRH pe suprafața celulei hipofizare) care va determina eliberarea bruscă a unei cantități foarte mari de LH ("pick" ovulator). Concentrațiile maxime ale LH sunt responsabile de producerea ovulației. După ovulație corpul galben va produce progesteron care va inhiba secreția pulsatilă a GnRH la 3 -5 ore, favorizând secreția de FSH în timpul tranziției de la faza luteală la faza foliculară. Pe măsură ce secreția de progesteron scade, ritmul pulsatil de descărcare a GnRH crește, favorizând la începutul fazei foliculare, secreția de FSH.

21.1.2 ROLUL HIPOFIZEI

La nivel hipofizar există o serie de factori care acționează paracrin și autocrin și reglează, de asemenea, sinteza și secreția gonadotropinelor. Astfel celulele gonadotrope sintetizează și eliberează peptide care aparțin familiei factorului de creștere TGF ("transforming growth factor"). Un astfel de peptid este activina a cărei sinteză este stimulată de pulsațiile scăzute ale GnRH. Activina va determina stimularea transcripției FSH. Un alt peptid din familia TGF este folistatinul, care este secretat de celulele gonadotrope hipofizare ca răspuns la secreția pulsatorie rapidă a GnRH. Folistatinul se va lega de activină și în consecință va determina scăderea secreției de FSH.

21.1.3 OVARUL

Ovarul este implicat în reglarea ciclului menstrual atât prin secrețiile de hormoni steroizi care reglează axul hipotalamo-hipofizar cât și prin secreția de peptide intraovariene

care aparțin familiilor factorilor de creștere TGF, IGF ("insulin-like growth factor") și EGF ("epidermal growth factor") și care modulează dezvoltarea foliculară, sinteza hormonilor feminini și ovulația.

În faza foliculară nivelurile estradiolului, progesteronului și LH-ului sunt scăzute și relativ constante, în timp ce concentrațiile FSH-ului cresc (figura 21.1). Ca răspuns la acțiunea FSH, în primele patru zile ale menstruației sunt selectați câțiva foliculi, iar dintre aceștia va fi ales foliculul dominant, între zilele cinci și șapte ale ciclului menstrual. Acest folicul continuă să crească și eliberează factori ce suprimă maturarea celorlalți foliculi selectați. Odată cu creșterea foliculară, concentrațiile de estradiol cresc și exercită o reglare de tip feedback negativ asupra axului hipotalamo-hipofizar, care are ca efect scăderea nivelului FSH-ului la mijlocul fazei foliculare. Prin contrast, nivelurile LH-ului, scăzute în prima parte a fazei foliculare, încep să crească la mijlocul fazei, ca răspuns la acțiunea stimulatorie a estradiolului.

Ovulația, eliberarea preovulului din foliculul ovarian, are loc de obicei în jurul zilei a 14-a dintr-un ciclu menstrual de 28 de zile. Cu puțin timp înainte de ovulație, secreția de estradiol a foliculului dominant crește semnificativ, determinând o eliberare masivă de LH și la o creștere de mai mică amplitudine, a FSH. Au fost raportate creșteri ale concentrației prostaglandinelor în fluidul folicular înainte de ovulație, sugerând un mecanism de implicare a prostaglandinelor în ruptura foliculului.

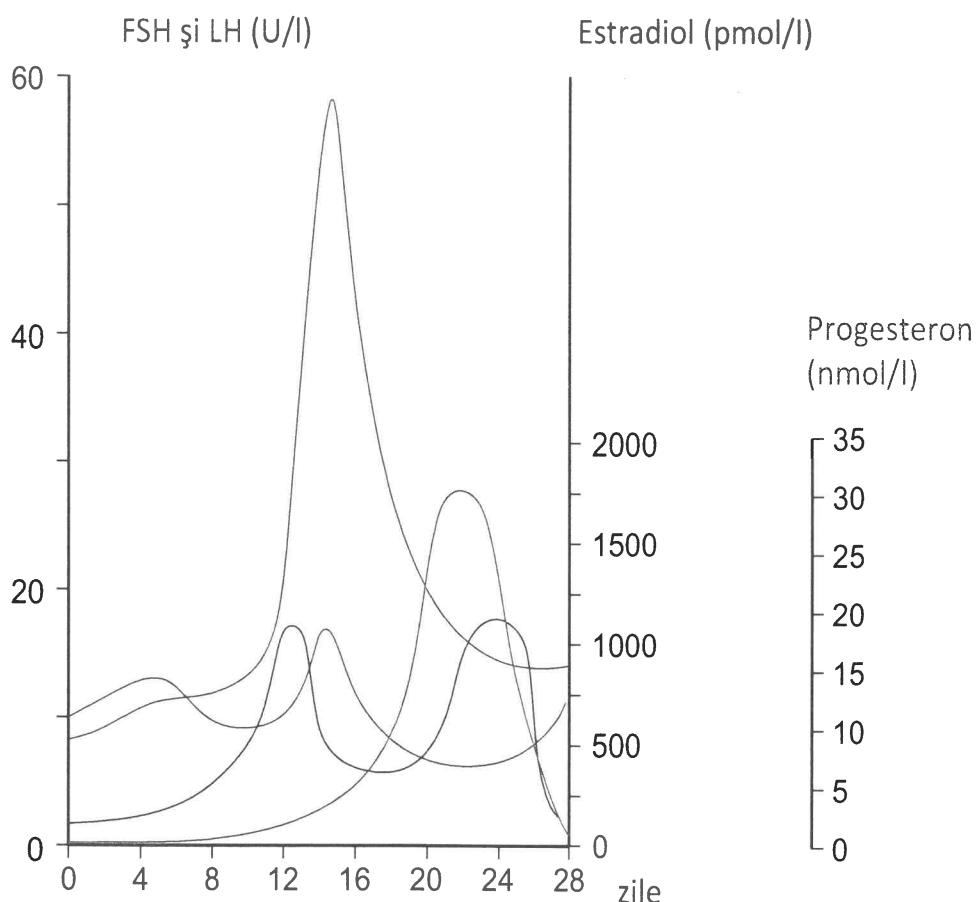


Figura 21.1 Secrețiile hormonale (hipofizare și ovariene) în cele trei faze ale ciclului menstrual

În faza luteală foliculul rupt se transformă în corp galben, sediu al secreției de hormoni steroizi ovarieni. Progesteronul produs de corpul galben manifestă o creștere a concentrației la 3 zile după ovulație, iar nivelurile sale crescute inhibă secreția de LH. Nivelurile de estradiol cresc de asemenea, în timpul fazei luteale și împreună cu progesteronul determină o scădere progresivă a concentrațiilor de FSH și LH. În ultimele zile ale fazei luteale, nivelurile de estradiol și progesteron scad, iar lipsa controlului de tip feedback negativ va conduce la creșterea nivelurilor de FSH și recrutarea unui nou set de foliculi pentru următorul ciclu menstrual.

21.2 FIZIOLOGIA REPRODUCTIVĂ MASCULINĂ

Similar organismului feminin, în cazul celui masculin controlul funcției gonadale începe cu eliberarea pulsatilă (la 30-120 minute) din hipotalamus a GnRH. GnRH este transportat prin sistemul hipotalamo-hipofizar până la hipofiza anterioară, unde stimulează eliberarea în principal de LH, dar într-o concentrație mai mică și a FSH.

LH ajuns pe cale sangvină la nivelul testiculelor, se fixează pe receptori de tip serpentină situați pe membrana celulelor Leydig. Complexul LH-receptor este cuplat cu o proteina Gs, care va stimula adenilat ciclaza și în consecință va crește concentrația intracelulară a AMPc, care e considerat mesagerul secund al LH. Prin intermediul AMPc, LH stimulează steroidogeneza testiculară, stimulând expresia genei care codifică StAR ("steroidogenic acute regulatory protein"), moleculă responsabilă de transportul colesterolului în mitocondrie, această etapă fiind etapa reglatorie în sinteza hormonilor masculini. Secreția de LH este controlată prin feedback negativ de către testosteron și estradiol, care acționează atât la nivel hipofizar cât și hipotalamic. S-a demonstrat experimental că estradiolul e un inhibitor mai potent al secreției LH, decât testosteronul și de aceea se consideră că principalul inhibitor androgenic la nivelul hipotalamusului este estradiolul (figura 21.2). Sub acțiunea LH celulele Leydig sintetizează și alte molecule care au acțiune paracrină și modulează funcția testiculară.

Nivelurile FSH prezintă variații mai puțin importante, deoarece răspunsul FSH la acțiunea GnRH este mult mai lent și manifestă o intensitate mult mai scăzută, iar FSH are un timp de înjumătățire mai mare decât LH. În timpul pubertății, FSH stimulează diviziunea și maturarea celulelor Sertoli. La adulți, FSH eliberat în circulația sistemică se leagă la receptorii situați pe celulele Sertoli, având ca mesager secund tot AMPc. Sub acțiunea FSH este inițiată transcripția și sinteza proteinei transportoare de androgeni (ABP – "androgen binding protein"). ABP eliberat intratesticular, va permite legarea testosteronului produs de celulele Leydig și direcționarea acestuia către tuburile seminifere, unde este responsabil de spermatogeneză. Practic prin fixarea testosteronului de către ABP, peste 95% din acest hormon rămâne la nivel testicular și doar un procent foarte mic este eliberat în circulația sistemică.

Celulele Sertoli secretă și alte peptide incluzând factorul de creștere insulin-like (IGF1), transerină, inhibină. La bărbați s-a găsit doar inhibină B - peptid cu structură dimerică, care inhibă secreția de FSH hipofizară, fără să influențeze secreția de LH.

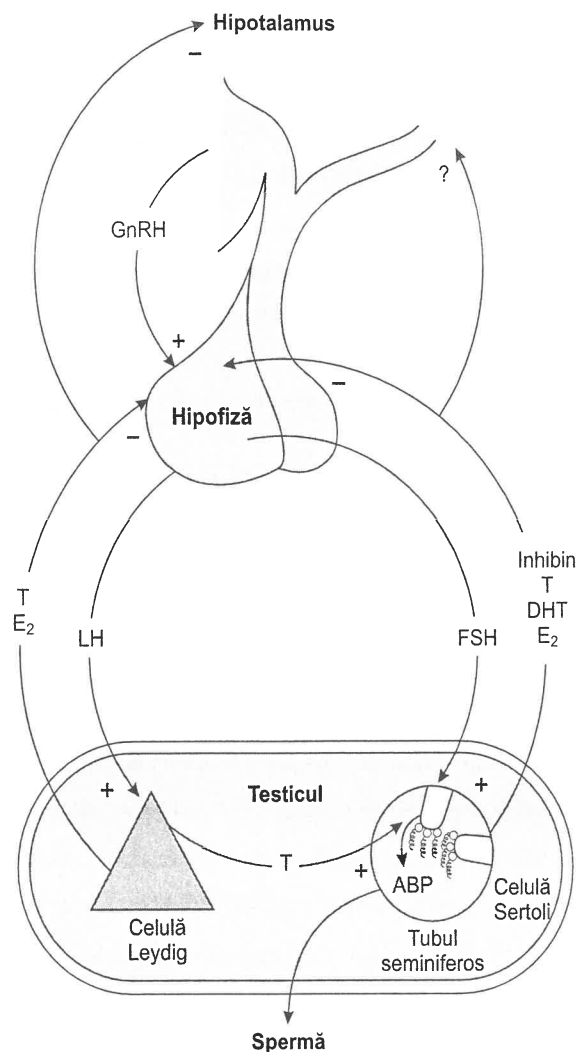


Figura 21.2 Reglarea funcției testiculare. GnRH-hormonul eliberator al gonadotropinelor, T –testosteron, DHT – dihidrotestosteron, E_2 –estradiol, ABP- proteină de transport intratesticulară a testosteronului.

21.3 SINTEZA HORMONILOR SEXUALI

Hormonii sexuali au ca precursor comun colesterolul. Colesterolul necesar sintezei hormonilor sexuali provine în principal din sânge (unde este transportat de către particulele lipoproteice LDL). Sub acțiunea hormonilor hipofizari FSH și LH este facilitată preluarea colesterolului de către celulele implicate în sinteza hormonilor sexuali, prin creșterea expresiei receptorilor pentru LDL pe suprafața acestor celule. Secundar, colesterolul poate fi sintetizat și local, pornind de la acetil-CoA. Colesterolul esterificat, depozitat în citoplasma celulelor, este transformat în colesterol liber sub acțiunea unei esteraze. Colesterolul liber este transportat în mitocondrii de o proteină de transport, StAR ("steroidogenic acute regulatory protein"), iar etapa de transport reprezintă etapa limitantă de viteză a sintezei hormonilor sexuali. Colesterolul este convertit la pregnenolonă sub acțiunea enzimei de clivare a catenei laterale care are drept cofactor citocromul P_{450} (P_{450} scc - cytochrome P_{450} side chain cleavage). Citocromul P_{450} funcționează în acest caz ca un transportor de electroni; procesul implică și

intervenția proteinelor transportoare de electroni adrenodoxina și adrenodoxin reductaza. În urma acțiunii enzimei de clivare este îndepărtat un fragment de șase atomi de carbon de la catena laterală, sub forma aldehidei isocaproice, rezultând pregnenolona, un compus cu 21 de atomi de carbon.

Această cale este comună cu a hormonilor sintetizați în celulele corticosuprarenalei. Corticosuprarenala este formată din 3 zone celulare, fiecare zonă sintetizând un anumit tip de hormon: celulele zonei glomerulare produc aldosteron, celulele zonei fasciculate produc cortizol, iar celulele zonei reticulate produc androgeni, în special dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS). Aceste diferențe se explică prin faptul că celulele din corticosuprarenală, ovar și testicul au echipamente enzimatice diferite permițând sinteza doar a unui singur tip de hormon.

21.3.1 STEROIDOGENEZA TESTICULARĂ

Sinteza testosteronului are loc la nivelul celulelor Leydig testiculare. Conversia pregnenolonei la testosteron implică acțiunea a cinci enzime: 3- β -hidroxisteroid dehidrogenaza (3 β HSD), $\Delta^{5,4}$ izomeraza, 17 hidroxilaza, C_{17-20} liaza și 17- β -hidroxisteroid dehidrogenaza (17 β HSD), iar calea de sinteză se numește calea progesteronului (sau calea Δ^4). Pregnenolona poate fi convertită la testosteron și pe calea dehidroepiandrosteronei (calea Δ^5), care reprezintă principala modalitate de sinteză a testosteronului la nivelul celulelor Leydig (figura 21.3).

Testosteronul produs în testicul este parțial metabolizat într-un derivat biologic activ, dihidrotestosteronul (DHT), sub acțiunea unei 5- α -reductaze NADPH dependente. DHT reprezintă principalul metabolit al testosteronului, iar concentrația sa plasmatică reprezintă aproximativ o zecime din cea a testosteronului.

La nivel testicular sunt produse și mici cantități de estradiol din testosteron, în prezența unui complex enzimatic numit aromatază.

21.3.2 STEROIDOGENEZA OVARIANĂ

Sinteza hormonilor sexuali feminini implică aceleași etape descrise la hormonii masculini. Estrogenii (estrone, estradiolul și estriolul) sunt formați prin acțiunea aromatazei asupra testosteronului și androstendionei, printr-un proces ce include trei etape, fiecare dintre ele necesitând O_2 și NADPH. Complexul aromatazei transformă testosteronul în estradiol și androstendiona în estronă.

Celulele ovariene sintetizează diferite tipuri de hormoni în funcție de echipamentul enzimatic (ipoteza "interacțiunii celor două celule"). Celulele tecale și celulele granuloase sunt sub controlul LH, respectiv FSH. Prin fixarea gonadotropinelor pe receptorii membranari ai celor două celule are loc creșterea concentrației intracelulare a AMPc (mediatorul secund al FSH și LH) cu activarea factorului de transcripție 1 (SF-1), care este responsabil de sinteza StAR (acesta acumulându-se în celulele ovariene, va stimula transportul colesterolului din citoplasma celulelor în mitocondrii).

Celulele tecale și celulele interstițiale secundare sunt lipsite de aromatază și sintetizează în principal hormoni androgeni (androstendiona din 17-OH-pregnenolona, pe calea Δ^5). Celulele

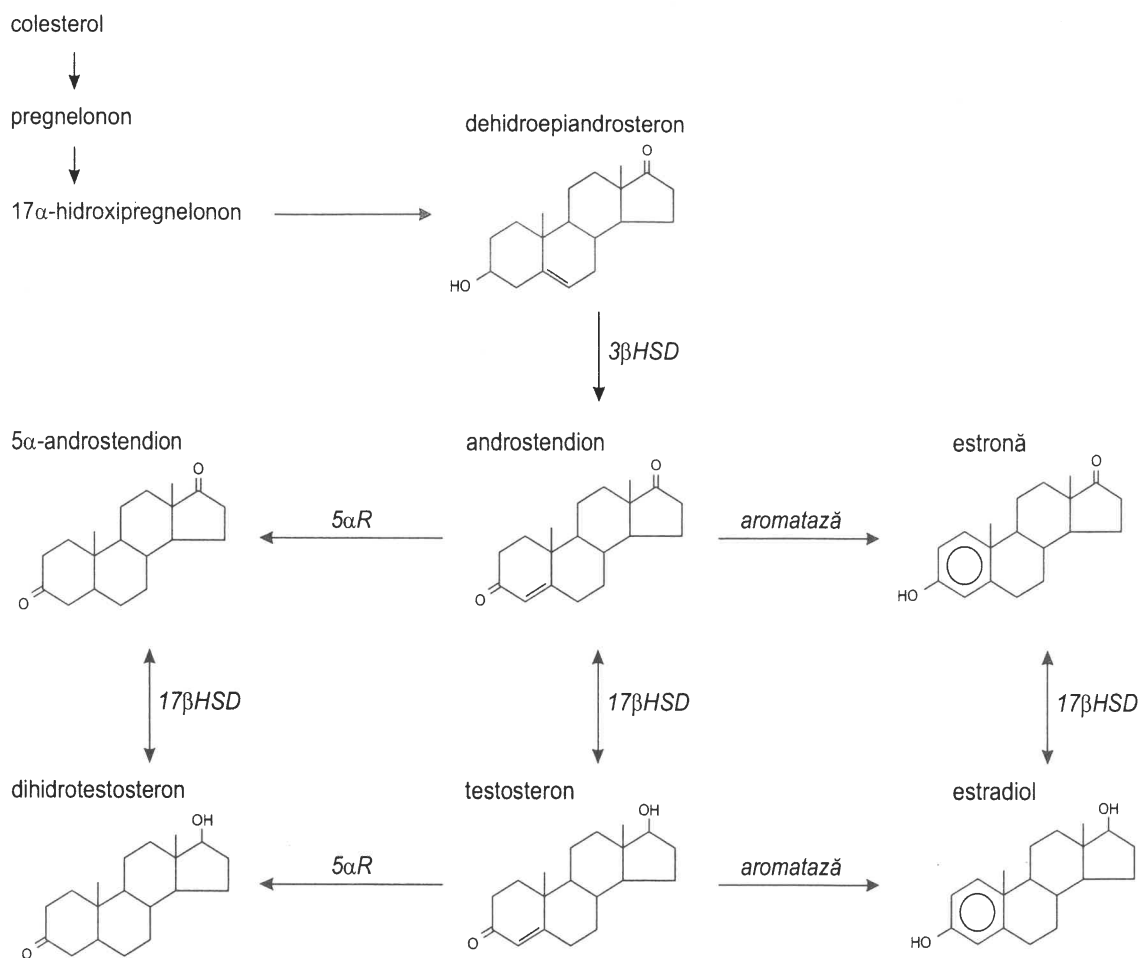


Figura 21.3 Sinteza hormonilor sexuali. 3 β HSD 3- β -hidroxisteroid dehidrogenaza, 17 β HSD 17- β -hidroxisteroid dehidrogenaza, 5 α R - 5- α -reductaza

granuloase sunt lipsite de 17 α -hidroxilază și în consecință sintetizează estrogeni (în special estradiol) din androstendion provenită din celulele tecale în faza proliferativă (figura 21.4).

Celulele cutanate și adipose au de asemenea, capacitatea de a sintetiza și metaboliza hormoni sexuali. Adipocitele pot prelua hormoni steroizi și îi pot metaboliza pe calea aromatazei. Pielea, de asemenea, sintetizează și eliberează testosteron utilizând ca precursori DHEAS și androstendion.

Principalii hormoni androgeni includ DHEAS, androstendion și testosteronul. În perioada fertilă a femeii, ovarele sunt responsabile de o treime din producția de testosteron, celelalte două treimi provenind din periferie (piele) prin transformarea în special a androstendionului produsă în ovar și corticosuprarenale. La bărbați doar 5% din testosteronul plasmatic provine din conversia periferică a androstendionului. La femei se estimează că peste 60% din dihidrotesteronul circulant, cel mai potent androgen, este produs la nivel periferic (în piele, care conține 5 α reductaza tip 1 și 2) prin conversia androstendionului. Totuși cel mai abundent androgen circulant în sângele femeii este DHEAS, produs în cantitate de peste 95% în corticosuprarenale, dar această moleculă nu poate fi convertită la testosteron.

Estrogenii circulanți includ estron, estron-sulfat, estradiol și estriol (în sarcină). Principalul estrogen – estradiolul este produs în principal în ovare (95%). În contrast, estron

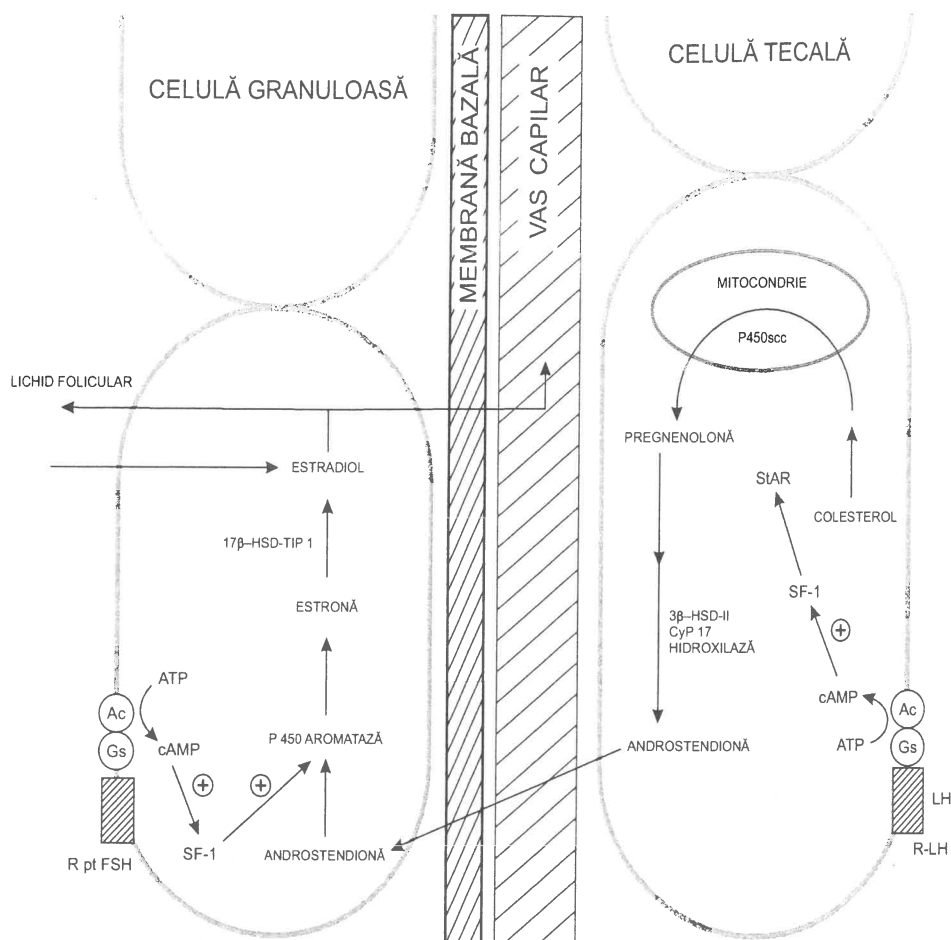


Figura 21.4 Sinteza estrogenilor în faza proliferativă (ipoteza "interacțiunii celor două celule"). La nivelul foliculului ovarian sinteza de estradiol este dependentă de interacțiunile între celulele tecale și celulele granuloase. R-LH receptorul pentru LH, Gs –proteina Gs, cAMP – adenozinmonofostat ciclic, SF-1 factor de transcripție 1, StAR - stroidogenic acute regulatory protein"), P₄₅₀cc –citocromul P450, 3βHSD 3-β-hidroxisteroid dehidrogenaza, RFSH receptor pentru FSH, P₄₅₀scc – enzima de clivare a catenei laterale a colesterolului, care are drept cofactor citP₄₅₀.

provine 50% din ovare și restul din conversie periferică (țesut adipos, folicul pilos, ficat) prin aromatizarea androstendionei. Estrona poate proveni și din estradiol sub acțiunea 17β-hidroxisteroid dehidrogenaza tip 2 sau din estron-sulfat (sub acțiunea unei steroid sulfataze). În faza luteală, celulele granuloase ale corpului galben devin vascularizate și exprimă pe suprafață receptori atât pentru LH cât și pentru FSH. Sub acțiunea LH sunt induse enzimele implicate în sinteza progesteronului (enzima de clivare a catenei laterale, P450scc, 3βHSD), iar sub acțiunea FSH - este indusă aromataza implicată în sinteza estradiolului. Androstendiona produsă în celulele tecale, ajunge pe cale sangvină în celulele granuloase ale corpului luteal, unde este transformată în progesteron (sub acțiunea LH) și în estradiol (sub acțiunea FSH) (figura 21.5).

21.3.3 TRANSPORTUL PLASMATIC AL HORMONILOR SEXUALI

Hormonii sexuali sunt liposolubili și necesită proteine pentru transportul plasmatic. Pe lângă albumină, ei sunt transportați de proteine specifice: proteina de transport a hormonilor

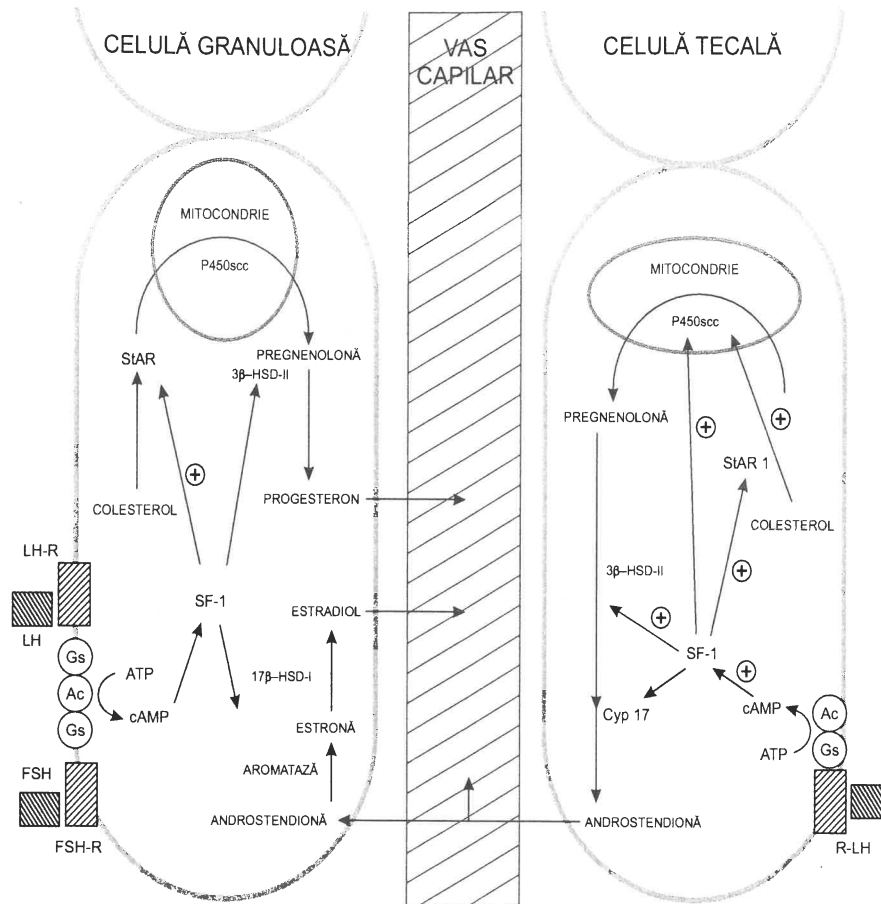


Figura 21.5 Sinteza hormonilor feminini în faza luteală (ipoteza "interacțiunii celor doua celule"). Celulele granuloase ale corpului galben secretă în principal progesteron (sub acțiunea LH) dar și mici cantități de estrogeni (sub acțiunea FSH), precursorul fiind androstendiona secretată în celulele tecale. R-LH receptorul pentru LH, Gs –proteina Gs, cAMP – adenozinmonofostat ciclic, SF-1 factor de transcripție 1, StAR - stroidogenic acute regulatory protein), P_{450}^{cc} –citocromul P450, 3βHSD 3-β-hidroxisteroid dehidrogenaza, RFSH receptor pentru FSH

sexuali (SHBG- sex hormone binding globulin), care transportă testosteronul și estradiolul, și transcortina (numită și proteina de transport a corticoizilor CBG- corticoid binding globulin), care transportă glucocorticoizi și progesteron.

SHBG este produsă în ficat, iar sinteza ei este stimulată de estrogeni (la femei nivelul SHBG este dublu față de bărbați), tamoxifen, fenitoin, hormonii tiroidieni, și inhibată de androgenii exogeni, glucocorticoizi, hormonul de creștere, obezitate. Afinitatea SHBG pentru androgeni este dublă față de cea pentru estrogeni. Frațiunea de hormoni sexuali transportați în plasmă legați de proteine este de 97-99%, astfel încât doar un număr limitat de molecule rămân libere în plasmă și pătrund în celulele țintă, fiind responsabile de activitatea biologică.

21.4 MECANISMUL DE ACȚIUNE AL HORMONILOR SEXUALI

La nivelul celulelor țintă, fiind liposolubili, hormonii sexuali traversează membrana citoplasmatică și își întâlnesc receptorul în nucleu. Toți membrii superfamiliei receptorilor nucleari au trăsături structurale și funcționale comune (figura 21.6), ceea ce demonstrează originea înrudită și moduri similare de reglare:

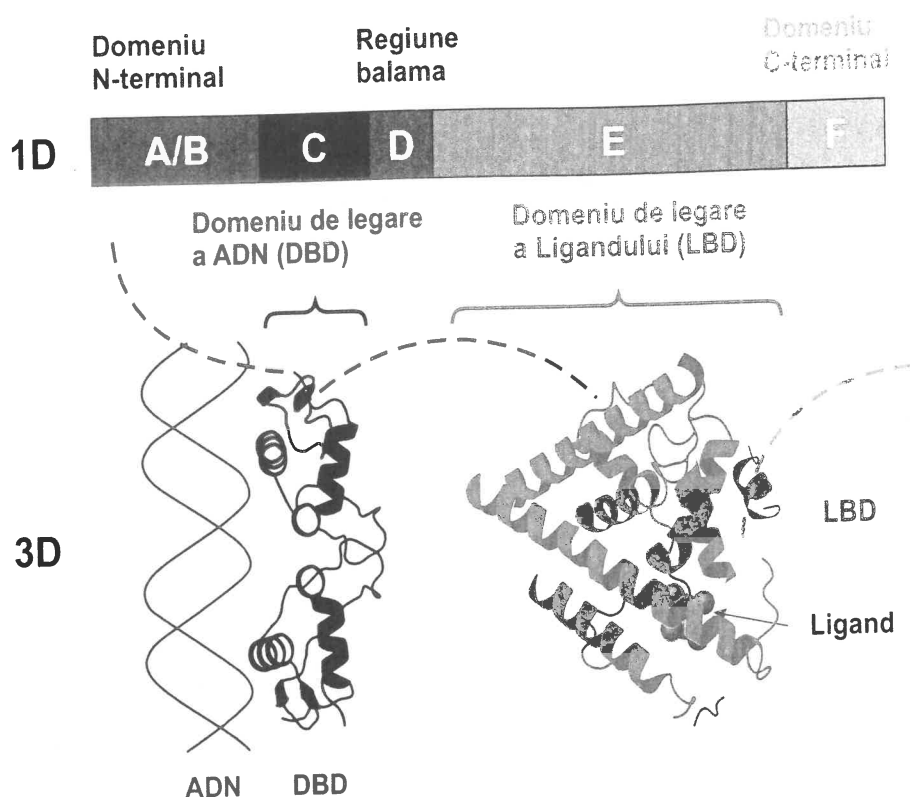


Figura 21.6. Structura schematică a receptorilor nucleari

1. AF1 – domeniu variabil, situat la capătul N-terminal, conține domeniile A și B – este implicat în activarea receptorului, independent de hormon;

2. DBD – DNA binding domain - segmentul de legare la ADN- conține domeniul C – compus din două domenii tip degete de zinc responsabile pentru legarea la secvența de ADN specifică;

3. Regiunea balama – domeniul D – conține un semnal de localizare nucleară și este implicată în interacțiuni cu molecule coreglatoare;

4. AF₂ – segmentul E - conține domeniul de legare a ligandului – hormonului (LBD – ligand binding domain) - domeniu activat alosteric în urma atașării ligandului, implicat în procesul de dimerizare a receptorului;

5. Domeniul carboxil terminal – segmentul F – presupus rol în dimerizarea receptorului.

Receptorii pentru androgeni și estrogeni formează homodimeri. Ei întâlnesc moleculele de hormoni în citoplasmă, iar complexul hormon-receptor este translocat în nucleu. Legarea hormonului la receptor determină disocierea receptorului de moleculele chaperone (molecule din clasa proteinelor de șoc termic – hsp90) și dimerizarea lui. Complexul hormon-receptor interacționează cu ADN la nivelul căruia determină disocierea moleculelor represoare și recrutarea moleculelor coactivatoare. Complexele receptor-molecule coactivatoare determină modificări și deplasări ale histonelor, ceea ce duce la decondensarea și expunerea unor porțiuni din cromatină. Complexele receptor-coactivator recrutează factori de transcripție (GTF) și ARN polimeraza II. Ele mențin cromatina în stare desfășurată și favorizează faza de elongare a transcripției, splicing-ul ARNm și în final degradarea factorilor de transcripție (Figura 21.7).

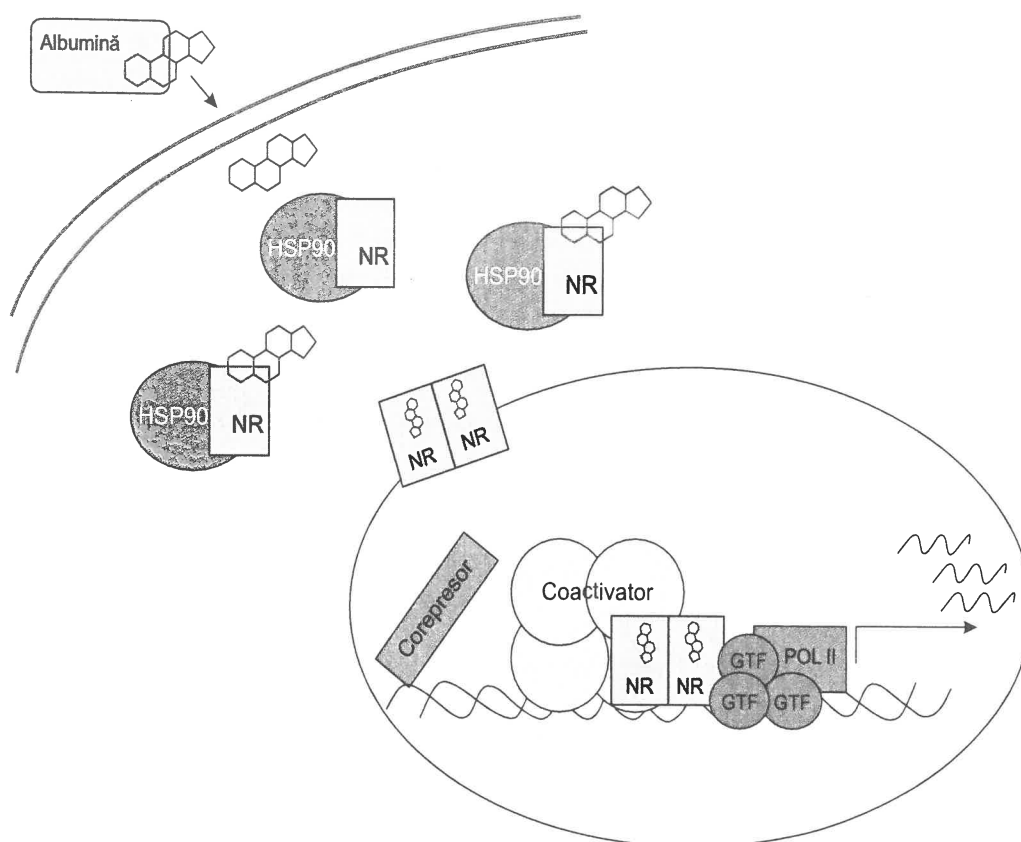


Figura 21.7 Mecanismul de acțiune al hormonilor sexuali. Hsp90 –proteine de șoc termic (heat shock protein), NR-receptorul hormonilor sexuali, GTF –factori de transcripție, POL II –polimeraza II

21.5 ACȚIUNILE FIZIOLOGICE ALE HORMONILOR SEXUALI

Estradiolul reprezintă principalul hormon estrogen feminin și este secretat în timpul fazei foliculare a ciclului menstrual. Concentrația sa variază în timpul ciclului menstrual (figura 21.1 și tabelul 21.I). Estradiolul este secretat în paralel cu dezvoltarea foliculilor și atinge un maxim înaintea ovulației. Dacă ovocitul eliberat de folicul nu este fertilizat, secreția de estradiol scade gradual. Nivelurile estradiolului scad în timpul menopauzei.

La bărbați, estrogenii sunt necesari pentru procesul de maturare a spermei. Hipogonadismul primar (răspuns inadecvat la gonadotropine, LH și FSH) poate determina creșterea secreției testiculare de estrogeni și a conversiei testosteronului la estradiol. Obezitatea poate determina de asemenea creșterea nivelurilor de estrogeni la bărbați. Creșterea raportului estrogeni/androgeni la bărbați este asociată cu ginecomastia.

Tabelul 21.I Concentrațiile plasmatice ale estradiolului la femeia adultă

Etapa	Concentrație estradiol (pmol/L)
Faza foliculară	< 300
Ovulație	500-3000
Faza luteală	150-1400
Menopauză	< 200

La femeile care iau anticoncepționale orale ce conțin estrogeni, nivelurile estradiolului pot fi nedetectabile, deoarece anticoncepționalele suprimă producția de estradiol a ovarelor. La femeile ce urmează terapii de substituție hormonală ce conțin derivați de estrogeni, valorile estradiolului plasmatic sunt crescute. La bărbați valorile estradiolului se încadrează în intervalul 0-200 pmol/L.

Progesteronul este principalul hormon secretat de ovar în timpul fazei luteale a ciclului menstrual. Rolul său este de a pregăti uterul pentru implantarea embrionului, în cazul în care fertilizarea are loc în timpul ciclului menstrual respectiv. Dacă fertilizarea are loc, este secretată gonadotropina corionică umană (hCG), ce are rol în menținerea corpului galben (*corpus luteum*), iar acesta, la rândul său, permite nivelurilor de progesteron să rămână crescute. La aproximativ douăsprezece săptămâni de gestație, placenta preia rolul corpului galben - de producție a progesteronului. După naștere și în timpul alăptării, nivelurile progesteronului scad. Principalele efecte fiziologice ale hormonilor feminini sunt prezentate în tabelul 21.II.

Tabelul 21.II Efectele fiziologice ale hormonilor sexuali feminini (E-estrogeni, P-progesteron)

Locul acțiunii	Efect
Uter	-endometru E: apariția endometrului de tip proliferativ; P: apariția endometrului de tip secretor;
	-miometru E: stimulează creșterea musculaturii și dezvoltarea de receptori pentru ocitocină; P: efecte adverse față de estrogeni;
	-glande cervicale E: favorizează secreția unui mucus bogat în apă și clorură de sodiu, care facilitează traversarea colului uterin de către spermatozoizi; P: secreția unui mucus vâscos bogat în mucopolizaharide și sărac în apă și clorură de sodiu, care limitează penetrația spermatozoidilor;
Epiteliu vaginal	E: stimulează proliferarea și maturarea celulelor din stratul funcțional și încărcarea cu glicogen a acestora; P: determină exfolierea stratului superficial al epitelului vaginal;
Glanda mamară	E: stimulează proliferarea stomei și a ductelor mamare; P: stimulează proliferarea acinilor glandulari;
Caractere sexuale secundare	E: stimulează apariția și dezvoltarea;
Metabolism proteic	E: stimulează sinteza SHBG și a proteinei de transport pentru tiroxină; -cresc nivelul factorilor de coagulare VII, IX, X și reduc nivelul anti-trombinei III; -cresc concentrația de angiotensinogen;
Metabolism fosfocalcic	E: cresc concentrația particulelor HDL și scad concentrația particulelor LDL, având efect antiaterogen;
Metabolism hidromineral	E: retenție de apă și sodiu; P: intră în competiție cu aldosteronul și scade retenția de apă și sodiu;
Temperatura bazală	E: reduc temperatura bazală prin acțiune asupra centrului termoreglator hipotalamic; P: crește temperatura bazală prin acțiune asupra centrului termoreglator hipotalamic

Testosteronul (T) și dihidrotestosteronul (DHT) sunt implicați în procese fiziologice atât în perioada prenatală, cât și postnatal. Principalele efecte fiziologice ale testosteronului și dihidrotestosteronului sunt prezentate în tabelul 21.III. T și DHT manifestă un puternic efect anabolic asupra metabolismului proteic. În cadrul metabolismului lipidic stimulează creșterea numărului particulelor LDL și scăderea concentrației particulelor HDL, manifestând efect aterogen.

Gonadotropina corionică umană (human chorionic gonadotropin - hCG) este un hormon glicoproteic alcătuit din două subunități cu structură diferită. Lanțul alfa prezintă similitudini structurale cu LH și FSH, în timp ce lanțul beta este specific pentru hCG. hCG este produs de către vilii corionici ai blastocistului implantat în uter și are rolul de a stimula producția de progesteron și estrogen de către corpul galben. hCG ajută la menținerea aprovizionării cu sânge a endometrului până când placenta începe să sintetizeze progesteron. Niveluri detectabile de hCG se înregistrează începând cu a 22-a zi de la data ultimei menstruații, ceea ce corespunde unui termen 8-11 zile de la concepție. În primele săptămâni de sarcină, nivelurile hCG cresc exponențial, dublându-se în fiecare săptămână. O dată ce placenta începe să producă progesteron, hCG nu mai este necesar, iar nivelurile sale încep să scadă la aproximativ 12-14 săptămâni de gestație. Sarcinile multiple vor determina valori ale hCG crescute (Tabelul 21.IV).

21.6 EVALUAREA FUNCȚIEI TESTICULARE

În laboratorul de analize medicale se realizează teste statice și dinamice pentru evaluarea funcției testiculare.

Tabelul 21. III Acțiunile fiziologice ale testosteronului și dihidrotestosteronului

Perioadă	Efect
Prenatal	-stimulează canalele lui Wolff, favorizează dezvoltarea organelor genitale interne, epididim, canale deferente; -stimulează sinusul urogenital, favorizează dezvoltarea organelor genitale externe și a prostatei;
Neonatal	- stimulează creșterea
După pubertate	- stimulează dezvoltarea organelor genitale externe și interne; -inițiază și mențin spermatogeneza; -stimulează creșterea pilozității cu stabilirea la finalul pubertății a modelului masculin de distribuție a pilozității; -creșterea laringelui și îngroșarea corzilor vocale, ceea ce determină tonalitatea mai joasă a vocii la bărbat; -stimularea dezvoltării aparatului locomotor, cu creșterea în înălțime la pubertate, mineralizarea mai accentuată a oaselor, dezvoltarea centurii scapulare, a mușchilor pectorali și ai umărului; - stimularea secreției de eritropoietină, cu creșterea numărului de hematii; -feedback negativ asupra FSH și LH; -stimulează dorința sexuală și potența.

Tabelul 21.IV Valorile normale ale gonadotropinei corionice umane (hCG)

	Valori normale (mUI/ml)
În afara sarcinii	< 8.0
În timpul sarcinii	
Săptămâna 1	3-100
Săptămâna 2	10-1.000
Săptămâna 3	100-10.000
Săptămâna 4	1.000-100.000
A doua lună de sarcină	15.000-200.000
A treia lună de sarcină	10.000-100.000

21.6.1 TESTE STATICE

Testele statice presupun spermograma, dozarea hormonilor androgeni, a estradiolului, a SHBG, a hormonilor hipofizari (FSH, LH, prolactina).

Dozarea testosteronului este dificilă deoarece secreția acestuia este pulsatilă și se indică prelevarea a cel puțin 3 probe de sânge periferic la interval de 20 -40 de minute care pot fi dozate separat sau serul obținut din cele trei recoltări este amestecat în concentrații egale și dozat ulterior testosteronul (a doua metodă este preferabilă din punct de vedere economic). La dozarea testosteronului trebuie ținut cont și de alte comorbidități ale pacientului ca de exemplu hipotiroidismul, obezitatea, acromegalia, afecțiuni în care nivelul plasmatic al SHBG este mai scăzut. În aceste situații se indică dozarea testosteronului liber care poate fi normal deși valoarea testosteronului total poate fi scăzută.

Dozarea gonadotropinelor presupune aceleași precauții ca și la testosteron deoarece sunt eliberate pulsatil (mai ales LH). Dozarea secreției bazale de LH și FSH are importanță în diferențierea hipogonadismelor hipergonadotrope (hipogonadismul primar, de cauză testiculară) de hipogonadismele hipogonadotrope (hipogonadismele secundare, de cauză hipofizară).

Dozarea prolactinei (PRL) este utilă în hipogonadismele hipofizare deoarece creșterea concentrației plasmatice a PRL determină scăderea secreției pulsatile a LH probabil prin acțiune inhibitorie la nivel hipotalamic. Dozarea prolactinei se indică a se efectua dimineața pe nemâncate, după un repaus de 30 de minute în clinostatism.

21.6.2 TESTE DINAMICE

Testul la gonadotropina corionică (hCG) (a se vedea subcapitolul 21.7.1.1 "Hipogonadismele masculine") se efectuează pentru diferențierea hipogonadismului primar de cel secundar.

Testul de stimulare cu clomifen citrat. Clomifenul este un steroid cu slabă acțiune estrogenică. Administat la bărbați se va fixa pe receptorii estrogenici blocând accesul estradiolului (obținut la nivel hipotalamic prin aromatizarea testosteronului) la receptorii proprii și prin acest efect practic secreția de GnRH hipotalamică, nu mai este inhibată. În consecință la persoanele sănătoase sub acțiunea clomifenului se obține o creștere a secrețiilor de LH, FSH și testosteron. Pacienții care au alterat axul hipotalamo-hipofizar nu prezintă o creștere a concentrațiilor celor 3 hormoni după stimularea cu clomifen.

Testul de stimulare cu GnRH este util în diferențierea hipogonadismului hipotalamic de cel hipofizar. Administrarea în bolus de GnRH este urmată de o creștere rapidă a LH și mai lentă a FSH. Pacienții cu afectare hipotalamică răspund pozitiv la test, pe când afectarea hipofizară va determina un răspuns negativ. Totuși în practica curentă s-au observat și răspunsuri pozitive la pacienții cu hipogonadism hipofizar moderat.

21.7 DISFUNCTII ALE GLANDELOR SEXUALE

21.7.1 ELEMENTE DE FIZIOPATOLOGIE A HORMONILOR SEXUALI MASCULINI

21.7.1.1. Hipogonadismele masculine

Se caracterizează prin insuficiența secreției de androgeni, a spermatogenezei, sau a ambelor funcții testiculare. Hipogonadismele sunt considerate primare (determinate de afecțiuni testiculare) sau secundare (determinate de afectarea hipofizei sau a hipotalamusului). Cele primare se mai numesc hipogonadisme hipergonadotrope (scăderea mecanismului de reglare prin feedback conduce la creșterea secreției de gonadotropine), iar cele secundare - se mai numesc hipogonadotrope (apar ca o consecință a scăderii secreției de gonadotropine cauzată de afectarea hipotalamusului sau a hipofizei). Hipogonadismele primare se datorează alterării fie a funcției tubilor seminiferi, fie a celulelor Leydig, fie a ambelor cauze. Afectarea funcției tubilor seminiferi conduce la infertilitate prin descreșterea producției de spermatozoizi, dar procesul de masculinizare decurge de obicei normal. Afectarea funcției celulelor Leydig, pe de altă parte, determină prăbușirea funcțiilor dependente de testosteron, inclusiv spermatogeneza. Efectele rezultate depind de vârstă - dacă secreția de testosteron este afectată după pubertate, caractere sexuale masculine sunt în parte menținute.

Având în vedere că secreția de gonadotropină și testosteron are caracter pulsatil, testele biochimice sunt uneori insuficiente pentru a permite diferențierea între hipogonadismele primare și secundare. În general, disfuncțiile tubilor seminiferi sunt asociate cu creșterea concentrației plasmatice de FSH, în timp ce afectarea celulelor Leydig se însoțește de creșterea concentrației plasmatice de LH. Pentru testarea funcției celulelor Leydig se poate folosi gonadotropina corionică umană (hCG), care are acțiune similară cu LH. La administrarea de hCG în mod normal nivelurile plasmatice ale testosteronului cresc, apropiindu-se de limita superioară. În cazul unui hipogonadism primar nivelurile testosteronului nu se modifică, dar reacția poate fi normală în cazul hipogonadismelor secundare. Tratamentul hipogonadismelor masculine vizează corectarea cauzei ce a determinat afecțiunea. În cazurile în care este afectată sinteza de testosteron acesta poate fi administrat, dar redobândirea fertilității presupune tratament cu gonadotropine sau administrare pulsatilă de GnRH în cazul afectării hipotalamusului.

21.7.1.2. Ginecomastia

Este reprezentată de hipertrofia glandei mamare la bărbat și se datorează unui dezechilibru între concentrațiile estrogenilor și ale androgenilor și se poate manifesta unilateral

sau bilateral. La nou născuții de sex masculin poate apărea datorită expunerii la estrogenii materni. În timpul pubertății un procent de până la 50% dintre băieții sănătoși pot dezvolta o ginecomastie tranzitorie, ca răspuns la creșterea temporară a estrogenilor față de androgeni. Un grad minor de ginecomastie se poate manifesta și la vârstnici, ca urmare a scăderii secreției de testosteron.

Ginecomastia apărută în alt context decât cele enumerate este considerată patologică. Printre cauzele determinante se numără administrarea anumitor medicamente (digoxina, spironolactona, cimetidina, fenotiazinele), hipertiroidismul, tumori secretante de hCG sau estrogeni, sindromul Klinefelter.

21.7.2 ELEMENTE DE FIZIOPATOLOGIE A HORMONILOR SEXUALI FEMININI

21.7.2.1 Amenoreea

Se definește fie ca absența menarhei până la vârsta de 16 ani sau trei luni consecutive de absență a menstriei. În lipsa sarcinii, cauzele amenoreei pot fi multiple: genetice, anomalii anatomice, hipotalamice (insuficiența izolată de GnRH, amenoreea funcțională de cauză hipotalamică, la atlete de performanță, anorexia nervosa), hipofizare (hiperprolactinemia, distrucții ale hipofizei), ovariene.

21.7.2.2 Hirsutismul

Se caracterizează prin dezvoltarea excesivă a părului la femei în teritorii anatomice care în mod normal sunt lipsite de pilozitate (față, torace, linia albă, regiunea fesieră și intergenito-crurală). Cauza apariției hirsutismului este de obicei expunerea țesuturilor la niveluri crescute de androgeni. Această situație se poate datora fie unei secreții crescute de androgeni, fie unui nivel scăzut de SHBG, ceea ce conduce la creșterea fracției testosteronului liber.

La femei, în mod normal, jumătate din cantitatea de testosteron plasmatic provine de la nivelul ovarelor, fie sintetizat ca atare, fie prin conversie din androstendionă. Restul se sintetizează în țesuturile periferice, prin conversie din androstendionă și DHEA. Datorită gradului mare de interconversie a androgenilor, este dificil de stabilit sursa unei ușoare creșteri a nivelului plasmatic a testosteronului. În general, creșterile importante și rapide ale DHEA indică originea suprarenală.

21.7.2.3 Sindromul ovarelor polichistice

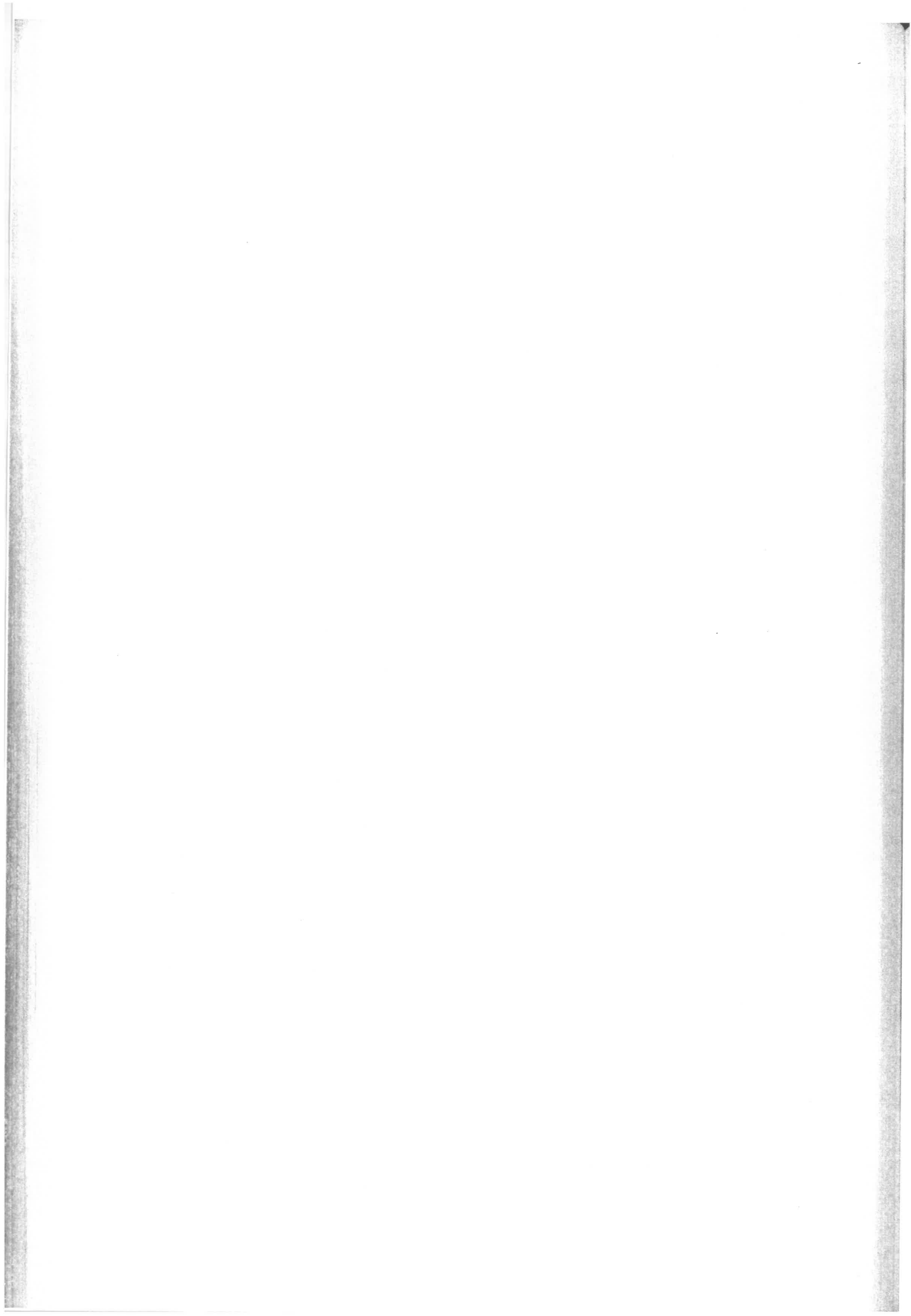
Reprezintă o entitate complexă, cu etiopatogenie incomplet elucidată. Există mai mulți factori determinanți incriminați, printre care: hipersecreția GnRH, care va determina hipersecreție de LH, având ca efect hipersecreție de androgeni; hiperproducție ovariană de androgeni datorită activității crescute, genetic determinate, a 17- α hidroxilazei; deficit funcțional de aromatizare a androgenilor în estrogeni, rezultat al unui dezechilibru între factorii stimulatori ai secreției de androgeni- LH, insulina și FSH; rezistența la insulină primară sau secundară obezității- hiperinsulinismul stimulează secreția de androgeni din teaca internă a foliculului ovarian (funcție LH-like), inhibă ruperea foliculului determinând anovulație, scade nivelul

SHBG, crescând nivelul testosteronului liber, activ. La nivelul țesutului adipos insulina stimulează aromataza, intensificând transformarea testosteronului în estrogeni, care inhibă FSH și stimulează LH.

Afecțiunea se manifestă clinic prin: anovulație cronică, hirsutism, tulburări menstruale, obezitate, iar biochimic prin creșterea androgenilor plasmatici, cu raportul LH/FSH > 2.

Bibliografie selectivă

1. Arneson W., Brickell J. *Clinical chemistry. A laboratory perspective*. F.A. Davis company, 2007.
2. Bhagavan N.V., Medical biochemistry, Academic Press, 4th Ed, 2001.
3. Clement KM HO. Testosterone testing in adult males. *Malaysian J Pathol* 2011; 33(2): 71-81.
4. Gardner DG, Shoback D, *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*, Mc Grow Hill Medical, 8th Ed, 2004
5. http://www.bpac.org.nz/BT/2013/February/02_hormones.aspx, *Reproductive hormones: The right test at the right time, for the right patient*. Best tests: February 2013.
6. Jerca L, Ungureanu D. *Biochimia hormonilor*, Ed. Terra nostra, Iași, 2001.
7. Kaplan A.L., Pesce A.J. *Clinical chemistry: theory, analysis, correlation*, Mosby Inc., 5th Ed, 2010, p.979-997.
8. Marshall W.J., Bangert S.K., Lapsley M.. *Clinical chemistry*, Mosby Inc., 7th Ed, 2012, p.167-179.
9. Stanišić V, Lonard DM, O'Malley BW *Modulation of steroid hormone receptor activity*, Progress in Brain Research, 2010, vol 118.



22

Hiperuricemia - Mecanisme de producere și implicații în patologia clinică

Mircea Cucuianu, Ioana Brudașcă

Acidul uric este un produs de metabolism al purinelor, iar hiperuricemia joacă un rol major în patogeniza gutei, contribuind și la dezvoltarea calculilor în tractul urinar, iar în unele cazuri determinând apariția insuficienței renale.

Deoarece guta s-a dovedit a fi cauzată de o depunere intraarticulară de urat monosodic, această patologie a fost considerată ca fiind o boală a articulațiilor de natură metabolică, iar atenția cercetătorilor s-a îndreptat spre studierea mecanismelor care duc la creșterea uricemiei și la precipitarea în țesuturi a uratului monosodic.

Totodată, observațiile clinice și de laborator au adus dovezi conform cărora hiperuricemia se asociază adesea cu obezitatea, hipertensiunea arterială, diabetul și hiperlipidemiile, survenind și la pacienții cu insuficiență renală.

În urmă cu mai bine de 30 de ani, investigându-se comportarea uricemiei în legătură cu tipul de hiperlipoproteinemie, s-a putut stabili că nivelul plasmatic de acid uric era mai crescut în tipurile IIb și IV, fiind corelat cu concentrația serică de trigliceride. Deoarece subiecții care prezentau aceste două tipuri de hiperlipoproteinemie erau compatibili cu conceptul de sindrom metabolic, iar activitățile plasmatice ale unor enzime de secreție hepatică (colinesteraza, gamaglutamiltransferaza și lecitincolesterolaciltransferaza) erau semnificativ crescute, s-a considerat că hiperinsulinemia și stimularea sintezei hepatice de enzime, incluzând probabil și pe cele implicate în metabolismul purinelor ar fi putut contribui atât la producerea hipertrigliceridemiei cât și a hiperuricemiei.

O mai bună înțelegere a mecanismelor care duc la hiperuricemie și la asocierea acesteia cu sindromul metabolic necesită o prezentare a căilor care duc la producerea și la îndepărtarea din plasmă a acidului uric.

22.1 SINTEZA ACIDULUI URIC

Acidul uric este un produs al metabolismului purinelor, iar atât adenozinmonofosfatul (AMP) cât și guanozinmonofosfatul (GMP) sunt supuse unui proces de dezaminare oxidativă, precum și acțiunii unei nucleotidaze care îndepărtează fosfatul. Inozina și guanozina rezultate sunt apoi convertite la baze purinice sub acțiunea unor nucleozidfosforilaze (PNPaze).



Detalii legate de catabolismul purinelor și de producerea acidului uric sunt prezentate în tabelul 22.1 și figura 22.1.

Tabelul 22.1 Bazele purinice, nucleozidele și nucleotidele corespondente

Bază	Nucleozid (bază + carbohidrat)*	Nucleotid (bază + carbohidrat + fosfat)
Adenină (6 aminopurină)	Adenozină	Acid adenilic (AMP)
Guanină (2 aminopurină)	Guanozină	Acid guanilic (GMP)
Hipoxantină (6 oxipurină)	Inozină (hipoxantin ribozid)	Hipoxantin ribotid
Xantină (2 - 6 oxipurină)	Xantin ribozid	Xantin ribotid

*carbohidratul poate fi riboza sau deoxiriboza

Trebuie însă menționat că spre deosebire de majoritatea mamiferelor, organismul uman nu poate oxida acidul uric la alantoină (compus cu solubilitate mai mare) din cauza absenței uricazei (oxidaza acidului uric). Se presupune că gena care codifică uricaza ar fi suferit mutații în stadiile timpurii ale evoluției speciei umane.

Rezervorul de purine supus catabolismului poate proveni și din alimentele bogate în purine cum ar fi carnea (mai ales viscerele și anumite specii de pește), iar dintre alimentele de origine vegetală, spanacul și sparanghelul.

Un proces de remaniere (turnover) accelerată a nucleoproteinelor poate surveni în legătură cu proliferările maligne ale sistemului hematopoietic, incluzând leucemii, limfoame, mielomatoze și poliglobulia. O remaniere accelerată a celulelor epiteliale din piele survenită la pacienții cu psoriazis poate de asemenea duce la o creștere moderată a uricemiei.

Cea mai importantă sursă de purine este totuși reprezentată de sinteza hepatică endogenă de purine. Se impune deci o evaluare a mecanismelor implicate în sinteza endogenă de purine și a mecanismelor care controlează acest proces. Așa cum reiese și din fig.1, sinteza hepatică de purine este un proces supus unei stricte reglări:

În etapa inițială ribozo-5-fosfatul se transformă în fosforibozilpirofosfat prin adăugarea a 2 molecule de fosfat (PRPP). Această reacție catalizată de PRPP sintetază este favorizată de prezența unei cantități crescute de substrat (ribozo-5-fosfat), rezultat prin activarea căii oxidative directe a carbohidraților (șuntul pentozo fosfatic). O dietă bogată în zahăr (zaharoză, compusă din glucoză și fructoză) va duce prin urmare la creșterea sintezei de purine și implicit a producției de acid uric.

Într-o a doua etapă grupul amino de pe glutamină este transferat pe pentozo-5-fosfat, cu formarea fosforibozilaminei și eliminarea pirofosfatului (PP). Această reacție, catalizată de PRPP amidotransferaza este inhibată de către produsul final al lanțului de reacții, respectiv de nucleotidele formate (AMP, GMP) dar și de ATP și ADP (inhibiție prin feed-back), prevenind astfel o acumulare excesivă de purine.

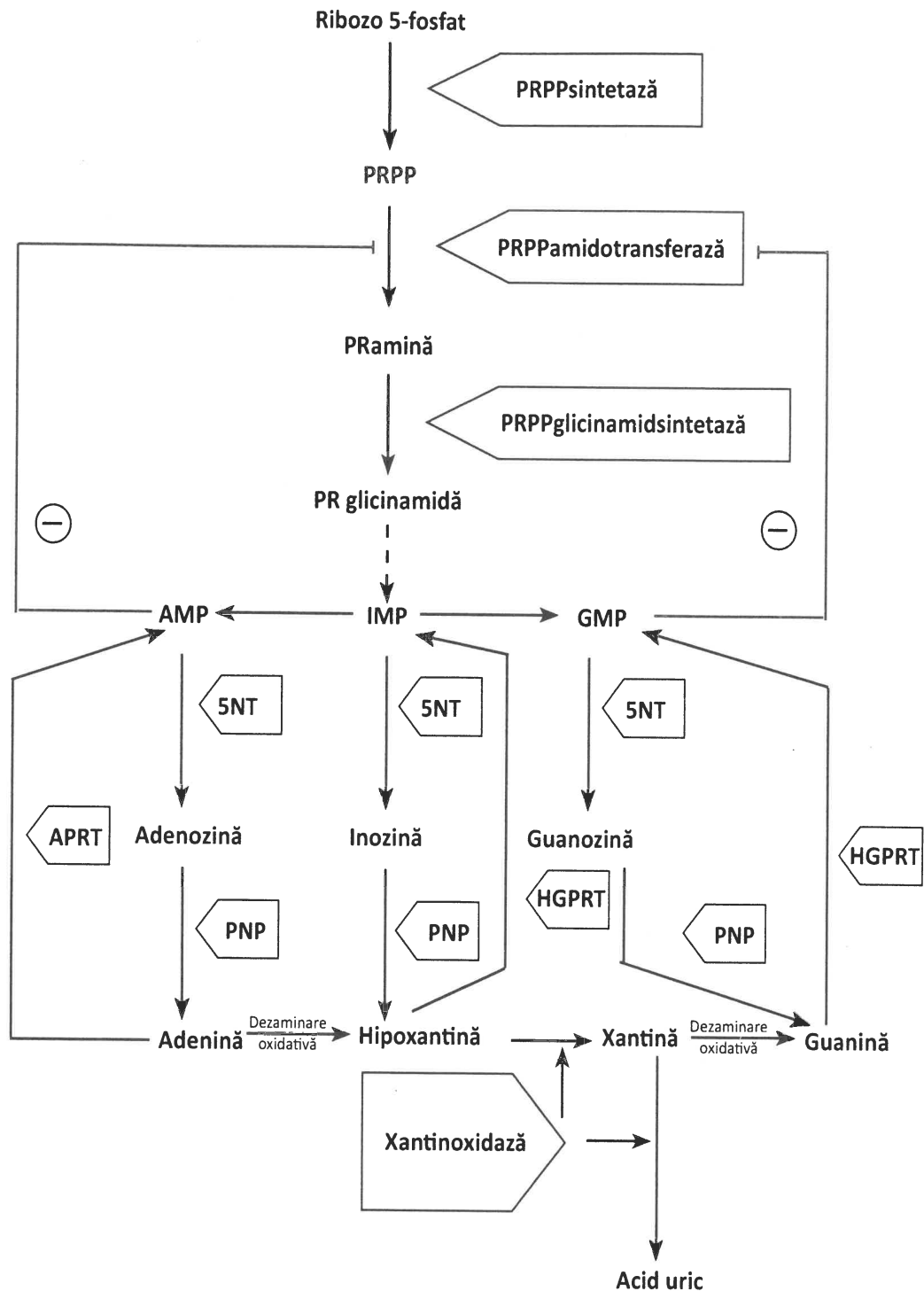


Figura 22.1 Reglarea sintezei nucleotidelor purinice și producerea acidului uric

PRPP sintetază – fosforibozilpirofosfat sintetază; PRPP – fosforibozilpirofosfat; PRPPamidotransferază – fosforibozilpirofosfat amidotransferază, PR amină – fosforibozilamină; PRPP glicinamid sintetază – fosforibozilpirofosfat glicinamid sintetază; PR glicinamidă – fosforibozil glicinamidă; AMP – adenozin monofosfat; IMP – inozinmonofosfat; GMP – guanozinmonofosfat; NT – nucleotidază; PNP – purin nucleozid fosforilază (nucleozidază). Sub acțiunea NT nucleotidele pierd gruparea fosfat și trec în nucleozide (ribozide). Bazele purinice se eliberează din nucleozide sub acțiunea purin nucleozid fosforilazei (PNP) conform reacției : ribozoguanină + fosfat $\xrightarrow{\text{HGPRT}}$ ribozo fosfat + guanină

În cadrul unui proces de cruțare a purinelor, acestea se vor include în nucleotide (IMP, GMP, AMP) sub acțiunea enzimelor HGPRT (hipoxantin guanozin fosforibozil transferază) și APRT (adenin fosforibozil transferază). Purinele care nu urmează această cale de cruțare se transformă în acid uric sub acțiunea xantin oxidazei.

Etaplele următoare implică adiția glicinei, reacție mediată de PRglicinamid sintetază, formilări mediate de transformilază și captarea unei alte grupări amino provenită tot din glutamină, precum și condensarea cu aspartat. Nucleotidele rezultate AMP și GMP sunt apoi implicate în controlul diferitelor căi metabolice.

Dereglări ale acestor secvențe enzimatice se vor repercuta și asupra economiei acidului uric. De exemplu, o mutație a unei gene localizată pe cromozomul X care controlează sinteza hipoxantinguaninfosforiboziltransferazei (HGPRT) determină o diminuare severă a reacțiilor de pe calea de salvare a purinelor, în sensul că hipoxantina și guanina nu vor mai reface nucleotidele AMP și GMP, ci vor fi catabolizate spre acid uric (Figura 22.1). Totodată, deficitul acestor nucleotide va duce la dereprimarea PRPPamidotransferazei, accelerându-se sinteza de PRamină și PRglicinamidă, iar acești compuși intermediari ai purinelor produși în exces o vor lua pe calea producerii de acid uric. Copiii de sex masculin cu deficit de HGPRT, așa zisul sindrom Lesch-Nyhan vor dezvolta hiperuricemie ducând la crize de gută, precum și la litiază urinară (calculi de acid uric), iar deficitul de purine (respectiv deficitul de nucleotide AMP și GMP) va fi implicat în dereglările neuropsihice incluzând retardare mentală, coreoatetoză, spasticitate și automutilare (mai ales roaderea degetelor). De notat că cea mai importantă activitate a HGPRT se exercită în mod normal în creier.

Sinteza *de novo* a purinelor are loc în cea mai mare parte în ficat, care este foarte bogat în PRPP amidotransferază, față de alte țesuturi cum ar fi măduva osoasă sau creierul, în care această enzimă este absentă sau exprimă activități minore. Sinteza extrahepatică de purine depinde de precursorii purinelor furnizați de ficat, sau de captarea purinelor eliberate prin degradarea nucleotidelor. Trebuie de asemenea amintit faptul că ficatul este irigat de fluxul portal bogat în metaboliți incluzând și acizi grași eliberați din țesutul adipos visceral, precum și hormoni eliberați din pancreas, iar astfel de metaboliți și hormoni pot exercita efecte stimulatorie asupra enzimelor implicate în sinteza purinelor. Aceste particularități anatomice și funcționale ar putea explica mecanismul patogenetic de asociere a hiperuricemiei cu sindromul metabolic. Este ilustrativ în acest sens că atât hiperuricemia cât și creșterea activității serice a butirilcolinesterazei, o enzimă de secreție hepatică, constituie indicii pentru riscul dezvoltării ulterioare a unui diabet de tip 2.

22.2 EXCREȚIA ACIDULUI URIC

Deoarece organismul uman nu este prevăzut cu uricază, fiind în consecință inapt să catabolizeze acidul uric, îndepărtarea oricărui exces de acid uric se realizează prin excreția acestuia. Aproximativ 25-33% din acidul uric produs este excretat de către celulele intestinale în lumenul intestinal și eliminat cu materiile fecale. Cea mai importantă și totodată cea mai controlată excreție se exercită însă la nivelul rinichilor. Transportul renal al uraților implică:

- a. filtrare glomerulară;
- b. reabsorbție tubulară aproape completă a uratului filtrat;
- c. secreție tubulară consecutivă;
- d. reabsorbție postsecretorie parțială în tubul contort proximal.

S-a demonstrat de asemenea existența unui schimbător renal al anionului urat (URAT 1) care reglează nivelul plasmatic de acid uric și s-a dovedit că URAT-1 produce uricozurie dacă este inhibat polul apical al celulelor tubilor renali (astfel de inhibitori fiind probenecid, benzbromarone, sulfinprazona, losartan). Dimpotrivă, compuși cum sunt nicotinatul, lactatul, β hydroxybutiratul, aceto-acetatul au efecte anti-uricozurice fiind utilizate în procesul de schimb anionic și eliminându-se în urină, în timp ce acidul uric este reabsorbit și deci reținut.

Insulina exercită de asemenea un efect de creștere a reabsorbției de acid uric, această acțiune fiind prezentă și la pacienții cu rezistență la insulină contribuind astfel la hiperuricemia semnalată în cazurile cu sindrom metabolic. Alături de insulină, angiotensina II și hormonul paratiroidian contribuie la retenția de urat. De menționat faptul că în comparație cu bărbații, femeile tinere prezintă concentrații semnificativ mai scăzute ale acidului uric plasmatic, sugerându-se un posibil rol al leptinei. De reamintit că sinteza leptinei este mai amplă în țesutul adipos subcutanat (repartizare de tip ginoid a depunerii de grăsime) decât în cel visceral (depunere de tip android a grăsimii) survenită la bărbați. În acest context s-a demonstrat că estrogenii stimulează sinteza leptinei, în timp ce androgenii inhibă această sinteză.

Complexitatea mecanismelor care reglează metabolismul și excreția acidului uric apare surprinzătoare pentru un produs de deșeu destinat îndepărtării din organism. S-au adus însă dovezi că acidul uric exercită nu doar efecte nocive, ci și efecte benefice, putând acționa în funcție de condiții atât proinflamator cât și ca agent antiinflamator datorită efectului antioxidant al uratului în soluție stabilă. Ca urmare, balanța între efectele nocive și cele benefice este mai degrabă instabilă în funcție de nivelul uricemiei dar și de condiții adiționale.

Nivelul plasmatic de acid uric este influențat de vârsta și sexul celor investigați. Copiii prezintă valori scăzute, acestea tinzând să crească după pubertate, ritmul de creștere fiind mai accelerat la băieți decât la fete. Așa se face că media valorilor normale ale uricemiei este de 4 mg/dl la femeile tinere (având însă tendință să crească după instalarea menopauzei) și de 6 mg/dl la bărbații adulți. Exprimând valoarea uricemiei în $\mu\text{moli/l}$ (conform Sistemului Internațional de Unități), valorii de 6 mg/dl îi corespund 356 $\mu\text{moli/l}$ (factorul de conversie fiind 59,485).

22.3 MECANISME PATOGENETICE ÎN DEZVOLTAREA HIPERURICEMIEI

Conform datelor din literatură, purinele rezultate prin sinteza de novo, precum și cele eliberate prin degradarea endogenă a acizilor nucleici pot urma una din următoarele două căi:

1. pot fi încorporate în acizii nucleici în curs de formare și
2. pot fi oxidate spre acid uric, care urmează a fi excretat prin intestin (25%) sau prin rinichi (75%).

Ca urmare, hiperuricemia poate surveni în următoarele situații relatate de către Zilva și Pannal în manualul redactat încă din 1972:

1. Creșterea producției de acid uric
 - a. ca urmare a sintezei accelerate de purine

b. prin aport alimentar crescut de alimente bogate în purine

c. ca urmare a amplificării procesului de reîmprospătare (turnover) a acizilor nucleici

2. Reducerea excreției de acid uric

Chiar dacă sinteza endogenă accelerată de purine constituie mecanismul cel mai important din punct de vedere cantitativ, o alimentație bogată în purine (în special viscere, pește, icre) poate agrava încărcarea metabolică.

Accelerarea procesului de turnover al acizilor nucleici în cursul proceselor maligne (leucemii, limfoame, terapie citostatică), dar și în cazuri de psoriazis, se poate solda de asemenea cu creșterea producerii de acid uric, iar hiperuricemia a fost detectată în cazurile cu insuficiență renală precum și la pacienții tratați cu diuretice tiazidice. Consumul de alcool care se metabolizează spre acid lactic exercită un efect de reducere a excreției de acid uric.

22.4 EFECTE NOCIVE ALE HIPERURICEMIEI

Solubilitatea în plasmă și în lichidul interstițial a acidului uric (urat monosodic monohidrat) poate fi scăzută dacă nivelul uricemiei depășește în mod evident valoarea de 6 mg/dl, iar precipitarea în țesuturi este favorizată de factori locali (scăderea pH-ului, traumatisme). Cristalele de urat monosodic monohidrat astfel precipitate determină apariția unui proces inflamator, care duce la acidifierea țesutului, dezvoltându-se un cerc vicios ce favorizează noi precipitări de urat. Se consideră că factorii locali ar juca un rol mai important decât gradul hiperuricemiei, semnalându-se atacuri de gută în cazul unor pacienți care prezentau doar creșteri moderate ale uricemiei, sau chiar valori normale.

Cel mai bine documentat efect nociv al hiperuricemiei este gută. Precipitarea cristalelor de urat monosodic monohidrat poate să se producă în orice articulație, dar de obicei prima criză survine la articulația halucelui. Depunerea cristalelor de urați se poate produce și în membrana sinovială și țesutul conjunctiv cu alte localizări, în special la nivelul tendonului lui Achille. De notat că artrita gutoasă este de aproximativ 10 ori mai frecventă la bărbați decât la femei. Depunerea cristalelor de urați determină un proces inflamator, principalele celule responsabile fiind macrofagele localizate în țesutul afectat (rezidente) care eliberează citokine proinflamatorii (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8), determinând un influx de neutrofile.

O caracteristică a atacului de gută este remisia spontană. Această evoluție auto-limitată implică mai multe mecanisme, fiind inițiată de îndepărtarea cristalelor de urat din articulații și continuând cu apoptoza celulelor proinflamatorii și degradarea proteolitică a citokinelor proinflamatorii. Efectele nocive ale hiperuricemiei în bolile cardiovasculare și renale au fost atribuite inducerii unei disfuncții endoteliale.

Efectul letal al hiperuricemiei apare concludent și în cazul precipitării uratului monosodic în rinichi, ducând la insuficiență renală. Un astfel de proces se dezvoltă în funcție de gradul hiperuricemiei, fiind accelerat de alcoolism, care accentuează acidifierea urinei, precum și de factori obstructivi postrenali care duc la diminuarea fluxului urinar, așa cum sunt calculii și polipii din tractul urinar, cea mai frecventă cauză cu efect agravant fiind adenomul prostatic. De fapt, o creștere persistentă a presiunii retrograde în tractul urinar se soldează cu

leziuni renale, care persistă și după îndepărtarea obstrucției. În lumina acestor date este de așteptat ca un bărbat hiperuricemic, cu adenom de prostată și consumator cronic de alcool să aibă un risc major pentru dezvoltarea unei nefropatii severe. Ca urmare, se recomandă ca în toate cazurile cu uricemie de peste 9 mg/dl să se aplice o terapie de reducere a nivelului plasmatic de acid uric, chiar dacă pacientul este asimptomatic.

Guta și hiperuricemia sunt adesea uitate, incidența acestor anomalii metabolice fiind subevaluată.

22.4.1 HIPERURICEMIA CA FACTOR DE RISC

Datele de fiziopatologie biochimică prezentate mai sus sugerează că hiperuricemia are un rol patogenetic major și au stimulat inițierea de studii prospective spre a stabili dacă această anomalie metabolică poate afecta mortalitatea și dacă hiperuricemia constituie un alt factor de risc care să fie luat în considerare în vederea unei terapii.

De obicei hiperuricemia este definită ca valoare a acidului uric seric mai mare de 7 mg/dl (416 μ mol/l) la bărbați și de peste 6 mg/dl (356 μ mol/l) la femei. O separare mai analitică a nivelelor plasmatice de acid uric pare a fi mai demonstrativă sub aspect patogenetic. Prin partajarea subiecților în quartile (Q), Tomita et al a ajuns la valori ale uricemiei de 0,3-4,9 mg/dl (Q1); 5-6,4 mg/dl (Q2); 6,5-8,4 mg/dl (Q3) și 8,5-13 mg/dl (Q4). Comparându-se riscul relativ (RR) de deces față de Q1 (RR=1), s-a constatat un risc relativ moderat crescut în Q3 (RR=1,17; $p < 0,05$), fiind semnificativ mai ridicat în Q4 (RR= 1,64; $p < 0,01$). Apare surprinzător în studiile lui Ames et al că riscul pentru deces în toate tipurile de cancer a fost mai scăzut la pacienții hiperuricemici (Q4 RR = 0,60) și moderat crescut la cei hipouricemici (Q1 RR=1,28), iar efectul protector față de cancer al uricemiei s-ar fi putut datora proprietăților antioxidante ale acidului uric solubil, o temă destul de controversată pentru Hiatt et al. Atât valori scăzute cât și valori crescute ale uricemiei s-au găsit la pacienții cu boli hepatice severe, în funcție de o eventuală insuficiență a sintezei hepatice de purine, sau ca urmare a colestazei și a consumului de alcool. În esență, studiile prospective efectuate pe un mare număr de subiecți semnaleză că hiperuricemia apare a fi un factor de risc minor, dar semnificativ pentru toate cauzele de mortalitate, dar nu poate fi considerată ca un factor de risc independent, exceptându-se nefropatiile ajunse la insuficiență renală în cazurile cu hiperuricemie accentuată. Se impune deci o monitorizare susținută a nivelului plasmatic de acid uric și a funcției renale, în încercarea de a detecta și de a încetini evoluția spre un stadiu final al insuficienței renale.

22.4.2 ÎNCERCĂRI TERAPEUTICE DE LIMITARE A HIPERURICEMIEI

În principiu, tratamentul hiperuricemiei ar consta în:

- 1.Reducerea consumului de alimente bogate în purine și a alcoolului. Astfel de măsuri nu sunt deosebit de eficiente, dar neglijarea lor poate agrava fenomenele.
- 2.Creșterea excreției urinare de acid uric cu ajutorul agenților uricozurici așa cum sunt probenecidul și salicilații în doze mari. Terapia uricozurică trebuie asociată cu un

consum sporit de lichide și cu alcalinizarea urinei, spre a evita precipitarea uratului monosodic în căile urinare și formarea de calculi. Terapia uricozurică este eficientă la pacienții cu funcție renală păstrată, devenind însă ineficace după instalarea unei insuficiențe renale.

3. Reducerea producției de acid uric se bazează pe inhibarea xantinoxidazei (vezi figura 22.1) cu alopurinol (hidroxi-pirazolopirimidină), care datorită structurii sale similare cu a hipoxantinei acționează ca un inhibitor competitiv.

Administrarea preparatelor de alopurinol pe cale orală se conduce în funcție de rezultatele terapeutice, respectiv de scăderea uricemiei. De obicei doze de 100-200 mg/zilnic sunt suficiente. Doze mari (până la 600mg/zi) au fost utilizate în cazul unui copil turc cu sindrom Lesch Nyhan, evoluând cu hiperuricemie severă. Această terapie s-a soldat cu formarea de calculi alcătuiți din xantină și hipoxantină localizați pe tractul urinar, caz prezentat de Hismi et al.

Așa cum s-a arătat anterior, precipitarea uratului monosodic în rinichi depinde și de factori obstructivi postrenali, așa cum este cazul bolnavilor cu adenom al prostatei. O terapie care nu reduce hiperuricemia, dar care ameliorează fluxul urinar și diminuează fenomenele neplăcute (nicturie, urinare dificilă) constă în administrarea clorhidratului de tamsulosin, un blocant al alfa1 adrenoreceptorilor. Acest preparat reduce tensiunea mușchilor netezi ai prostatei și uretrei și facilitează fluxul urinar. Reacțiile adverse ale unei astfel de terapii constau relativ frecvent (cam 10% din pacienți) în senzația de slăbiciune și pierderea echilibrului, mai ales la trecerea din clinostatism în ortostatism. Pacienții cu adenom de prostată și cei cu insuficiență cardiacă, care prezintă în mod frecvent nicturie sunt astfel mai expuși la această reacție adversă.

Terapia atacului de gută constă în administrarea de agenți antiinflamatori care nu au însă efect asupra uricemiei.

Terapia inflamației generate de precipitarea în țesuturi (mai ales în articulații) a acidului uric a făcut progrese remarcabile prin introducerea preparatelor din clasa coxibilor (etoricoxib). Aceștia sunt inhibitori ai ciclooxigenazei 2 (COX_2), o enzimă inductibilă sub acțiunea citokinelor proinflamatorii generate în fagocitele mononucleate. COX acționează asupra acidului arahidonic generând endoperoxizii PGG_2 și PGH_2 . În continuare endoperoxizii se transformă în tromboxan A_2 (Tx_2) sub acțiunea tromboxan sintetazei din plachetele sangvine, iar la nivelul endoteliilor se transformă în prostaciclina PGI_2 sub acțiunea prostaciclina sintetazei. În timp ce TxA_2 are drept efecte vasoconstricția și accelerarea agregării plachetare, prostaciclina determină vasodilatație și inhibarea agregării plachetare (vezi și capitolul 16).

De notat că activitatea de tip COX decurge sub două forme: COX_1 - constitutivă și răspândită în numeroase țesuturi incluzând mucoasa digestivă și COX_2 - inductibilă sub acțiunea citokinelor proinflamatorii și accentuând inflamația. Prin inhibarea selectivă a COX_2 , etoricoxib nu produce efecte negative asupra mucoasei tubului digestiv, dar atenuează inflamația. S-a arătat însă că activitatea inhibitorilor COX_2 nu este chiar atât de selectivă, inhibarea acestei enzime repercutându-se și asupra prostaciclina sintetazei din endoteliu, ducând implicit la

scoaterea din joc a unui mecanism antitrombotic. Utilizarea etoricoxibului ar putea crește riscul pentru infarct miocardic sau pentru accident vascular cerebral. Dată fiind eficiența acestor produse în rezolvarea crizelor de gută acute, nu s-a renunțat însă la acest preparat, recomandându-se însă administrarea limitată la perioada dureroasă acută și nu mai mult de 8 zile, doza zilnică fiind de 60 de mg. Este de reamintit faptul că bolnavii cu gută prezintă deseori dislipidemie și alți factori de risc cardiovascular.

22.5 EFECTE BENEFICE ALE URICEMIEI

Atribuirea unor efecte benefice unei substanțe incriminate în patogeneza gutei și a insuficienței renale ar apărea oarecum deplasată. Pe de altă parte, așa cum s-a arătat mai sus, organismul uman a dezvoltat mecanisme care reduc degradarea oxidativă a acidului uric și totodată limitează eliminarea urinară a acestuia, asigurându-se astfel menținerea unui nivel relativ constant al uricemiei. S-a mai constatat că atât nivelul plasmatic de acid uric cât și durata de viață sunt mai crescute la specia umană decât la alte specii. Trebuie însă precizat că efectele nocive sunt produse de acidul uric precipitat în țesuturi, iar efectele benefice se datorează uratului dizolvat în plasmă și în lichidul intraterstrial.

Un prim efect favorabil al uratului solubilizat s-a atribuit intervenției în reglarea tensiunii arteriale. La producerea experimentală la șobolani a unei hiperuricemii blânde prin administrarea de acid oxonic (un inhibitor al uricazei) s-a constatat că acești șobolani supuși la un regim sărac în sodiu își mențin tensiunea arterială, în timp ce animalele de control supuse la același regim desodat au prezentat o scădere progresivă a tensiunii arteriale. Watanabe et al a constatat că efectul reglator al acidului uric se exercită la nivelul sistemului renină angiotensină care joacă un rol major atât în reglarea tensiunii arteriale cât și a concentrației plasmatice de sodiu. S-a dedus că hominoizii care se alimentau cu fructe și frunze sărace în sodiu erau dezavantajați, nefiind capabili să dezvolte un răspuns cardiovascular adecvat la situații periculoase, iar cei care și-au dezvoltat mecanisme de răspuns la astfel de solicitări au prezentat un avantaj de supraviețuire. Pe de altă parte, în societatea modernă, în contextul unei diete bogate în sodiu, mecanismul mai sus menționat de menținere a unei sodemii adecvate grație anionului urat, s-a soldat cu actuala epidemie de boli cardiovasculare.

Un alt efect benefic atribuit acidului uric se referă la calitățile sale antioxidante. Se știe că radicalii de oxigen exercită efecte toxice, inițiind un lanț de reacții care duc la peroxidarea lipidelor și la leziuni ale ADN, ARN, a membranelor celulare și a organelor. În organismul uman s-a dezvoltat însă o rețea de mecanisme antioxidante cu rol protector, incluzând enzime cum sunt superoxidismutaza și glutatión peroxidaza, antioxidanți lipofili ca vitamina E (tocoferol) și β carotenul, precum și antioxidanți hidrofilici între care glutatiónul, vitamina C (acid ascorbic) și acidul uric. De remarcat structura acidului uric care se poate prezenta sub formă lactim sau lactam, implicând modificări ale poziției hidrogenului și a dublei legături.

S-a constatat că în concentrații fiziologice acidul uric prezintă efecte antioxidante similare cu cele produse de acidul ascorbic, iar protecția față de eventualele modificări ale ADN ar exercita un efect anticanceros, prelungind astfel durata de viață. Atenuând și eventualele

viciari ale structurilor neuronale, acidul uric ar fi în măsură să limiteze leziunile și fenomenele patologice în unele boli neurologice cum sunt boala Parkinson, boala Huntington și scleroza în plăci.

Chamorro et al a mai constatat că un nivel moderat crescut de acid uric ar crește șansele pentru o evoluție favorabilă la pacienții afectați de un atac de ischemie cerebrovasculară, o observație care întărește indirect rolul proceselor oxidative în dezvoltarea leziunilor cerebrale.

S-a încercat și stabilirea unor legături între nivelul seric de acid uric și inteligență, o afirmație mai greu de susținut, având în vedere că deficitul enzimei HGPRT și respectiv sindromul Lesch Nyhan evoluează cu nivele extrem de ridicate de acid uric și cu o retardare mintală severă. Retardul mental al acestor subiecți s-ar datora însă mai degrabă deficitului de nucleotide decât hiperuricemiei.

Un aspect mai frivol și mai puțin relevant patogenic se referă la efectul acidului uric în procesul de prevenire a înărunțirii. Se știe că îmbătrânirea este cauzată de o dereglare a echilibrului între generarea de oxidanți și producerea de antioxidanți. S-au adus și dovezi conform cărora stresul oxidativ intervine în procesul de înărunțire, radicalii superoxid afectând melanocitele și reducând producerea de melanină, iar prin acțiunea sa antioxidantă acidul uric ar încetini sau chiar preveni înărunțirea. De fapt, se pot observa persoane trecute de 80 de ani fără fire de păr albe, dar având nivele moderat crescute de acid uric.

22.6 PRESUPUSUL ROL PATOGEN AL HIPOURICEMIEI

Deși hepatocitele contribuie la sinteza acidului uric, scăderea moderată a uricemiei semnalată în boli hepatice nu are nici specificitatea nici sensibilitatea testelor utilizate în mod curent pentru diagnosticul și evaluarea gravității unei insuficiențe hepatice, iar rolul patogen al hipouricemiei nu a fost dovedit cu certitudine.

O hipouricemie severă survenită în deficitul familial al enzimei purin- nucleozid fosforilază (PNP-ază) se soldează cu manifestări clinice destul de caracteristice și de accentuate, subiecții afectați prezentând o imunodeficiență combinată severă. Aceasta se manifestă prin infecții repetate și prelungite, precum și prin disfuncții neurologice (ataxie, iritabilitate, ostilitate), iar din punctul de vedere al laboratorului se evidențiază o hipouricemie. Conform mecanismului de acțiune al PNPazei arătat anterior, rezultă că un deficit al acestei enzime se soldează cu o acumulare de nucleozide (inozină, guanozină) în celulele cu rol în imunitate și cu o reducere a eliberării purinelor (adenină, guanină) din nucleozide. Supraîncărcarea cu nucleozide exercită un efect toxic asupra celulelor, cu inhibarea sintezei de ADN în limfocitele T și B, a căror concentrație în sânge apare scăzută. Scăderea consecutivă severă a imunglobulinelor explică astfel deficitul imun.

Deoarece purinele nu se mai eliberează din nucleozide, se perturbă generarea de nucleotide cu rol în reglarea metabolismelor și în generarea de energie în sistemul nervos (AMP, cAMP, ATP). Se explică astfel atât deficitul imun cât și disfuncția neurologică. Nu există însă argumente pentru rolul patogen al hipouricemiei. Nu poate fi însă exclus ca hipouricemia accentuată survenită în cazurile cu deficit de PNPază să se soldeze și cu o reducere a po-

tențialului antioxidant, conform celor prezentate mai sus, accentuând astfel efectul nociv al unor procese inflamatorii care generează radicali superoxid.

De fapt hipouricemia survenită în cazurile cu deficit de PNPază este un fenomen secundar neimplicat în patogeneză și se explică prin reducerea eliberării de purine din nucleozide, iar purinele care nu urmează calea cruțării de purine (purine salvage pathway) mediata de HGPRT, trec și pe calea degradării spre acid uric. Prin reducerea eliberării de purine din nucleotide este firesc ca și generarea de acid uric să fie redusă.

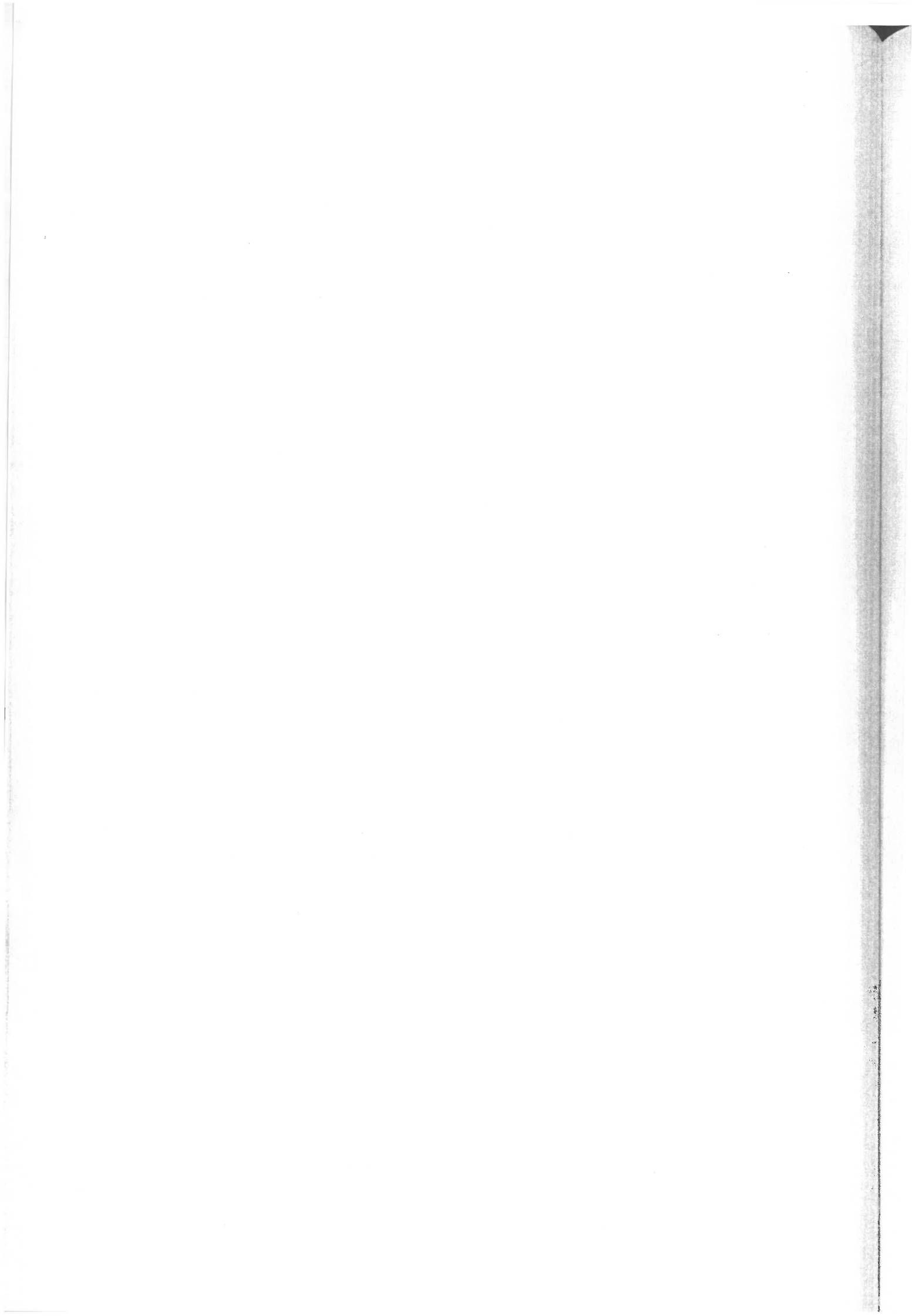
Bibliografie

1. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology and metabolism* 2000; 11(8): 327-32
2. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defence in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer:a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78(11):6858-62
3. Bedir A, Topbas M, Tnyeri F, Alvur M, Arik N. Leptin might be a regulatory of serum uric acid concentrations in humans. *Jpn Heart J* 2003; 44(4):527-36
4. Bhole V, Choi JW, Kim SW, De Vera M, Choi H. Serum uric acid levels and the risk of type 2 diabetes: a prospective study. *The American Journal of Medicine* 2010; 123: 957-61
5. Cammalleri L, Malaguarnera M. Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor lysis syndrome and gout. *Int J Med Sci* 2007; 4(2): 89-93
6. Chamorro A, Orbach V, Cervera A, Ravilla M, Deulofen R, Aponte JH. Prognostic significance of uric acid concentrations in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 2012; 33: 1048-52
7. Choi HK, Ford ES. Prevalence of metabolic syndrome in individuals with hyperuricemia. *Am J Med* 2007; 120(5):442-7
8. Choi HK, Mount DB, Reginato AM. Pathogenesis of Gout. *Ann Int Med* 2005; 143: 499-516
9. Cochino AV, Pérignon JL, Bătăneanț M, Craiu M, Gherghina I, Șerban M. Hypouricemia - the simple key towards diagnosis in a case of purine nucleoside phosphorylase deficiency, a rare and severe disease. *Rev Romana Med Lab.* 2014;22(3):321-3. DOI:10.2478/rrlm-2014-0027
10. Cucuianu M, Brudașcă I. Gout, hyperuricemia and the metabolic syndrome. *Revista Română de Medicină de Laborator* 2012; 20 (3):199-206
11. Cucuianu M, Opincaru A, Tapalagă D. Similar behavior of lecithin cholesterol acyltransferase and pseudocholinesterase in liver disease and hyperlipoproteinemia. *Clin Chim Acta* 1978; 85: 73-9
12. Cucuianu M, Zdrenghia D, Pop M, Opincaru A. Increased serum gamma-glutamyl transferase in hypertriglyceridemia; comparison with serum pseudocholinesterase. *Clin Chim Acta* 1976; 71 (3): 419-27
13. Cutler RG. Antioxidants and aging. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 373S-375S
14. Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH et al.
15. Fekete T. Metabolismul purinic și pirimidinic. Acidul uric. In M. Cucuianu, N Olinic, A Goia, T Fekete (editors). *Biochimie clinică*. Editura Dacia 1979; 267-302

16. Ferris TF, Gordon P. Effect of angiotensin and norepinephrin upon urate clearance in man. *Am J Med* 1968; 44:359-65
17. Gao X, Qi L, Choi K, Curhan G, Tucker KL, Ascherio A. Intake of added sugar and sugar sweetened drinks and serum uric acid in US men and women. *Hypertension* 2007; 50:306-12
18. Harper HA. Metabolism of nucleic acids and their derivatives. Review of physiological chemistry. Lange Medical Publications. Los Altos California 1965 305-17
19. Havel PJ. Dietary fructose: implication for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev* 2005; 63:133-157
20. Hennen IK, Huang J, Barret TD, Driscoll EM, Willems DE, Park KM, Crofford CJ, Luccheri BR. Effects of ciclooxigenase 2 inhibitors on vascular responses and thrombosis in canine coronary arteries. *Circulation* 2001; 104:820-25
21. Hiatt RA, Fireman BH. Serum uric acid unrelated to cancer incidence in humans. *Cancer Research* 1981; 48: 2916-8
22. Hismi B, Unal O, Sivri S, Dursun A, Tokath A, Coskun T. Lesch-Nyhan syndrome: a case complicated by recurrent xanthine, hypoxanthine stones due to allopurinol (abstract). The 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Sept 2013 Barcelona pag 164
23. Jin M, Yang F, Yang I, Luo JJ, Wang H, Yang XF. Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases. *Front Biosci* 2012; 17: 656-59
24. Johnson RG, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH et al. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome. Diabetes, kidney disease and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 86:1:899-906
25. Junker W. Gicht – die „vergessene“ Erkrankung trotz vieler therapeutischer Optionen. Zum Beitrag der DMW nr 33 (Dtsch Med Wochenschr 2011;136:1660-4) Korespondenz DMW 2011; 136:2382
26. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int* 2005; 67(6): 1784-9
27. Martin W, Walton M, Harper J. Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal induced murine peritoneal model of gout. *Arthritis and Rheumatism* 2009; 60 (1):281-9
28. Mintz DH, Canary JJ, Carreon G, Kyle LH. Hyperuricemia in hyperparathyroidism. *N Engl J Med* 1961; 265: 112-5
29. Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 2002; 417:447-52
30. Muscelli E, Natali A, Bianchi S, Bigazzi R, Galvan AQ, Sironi AM et al. Effect of insulin on renal sodium and uric acid handling in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1996; 9(8): 746-52
31. Myles A. Disorders of joints. In William and Marks (editors). *Biochemistry in clinical praxis*. William Heinemann Medical Books London 1983, 325-336
32. Rosenbaum M, Leibl RL. Role of gonadal steroids in the sexual dimorphisms, in body composition and circulating concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metabol* 1999; 84:1784-9
33. Saito KK, Haishi T, Maeda I, Koh K, Harita N, Uehara S, Onishi Y et al. Serum butyryl cholinesterase and risk of future type 2 diabetes. The Kansai health Care Study. *Clinical Endocrinology* (Wiley Online

Library) 2013 doi 101111/cen12171

34. Schmidt BMW, Wagner AD. Hyperurikämie, Gicht, Pseudogicht und Begleiterkrankungen. Dtsch Med Wochenschr 2011; 136: 2489-91
35. Ter Maaten JC, Voorberg A, Heine RJ, Ter Wee PM, Donker AJ, Gans RO. Renal handling of of urate and sodium during acute physiological hyperinsulinemia in healthy subjects. Clin Sci (London) 1997; 92:51-8
36. Tomita M, Mizuno S, Yamanaka H, Hosoda Y, Sakuma K, Matuoka Y et al. Does hyperuricemia affect mortality? A prospective study of japanese male workers. J Epidemiology 2000; 10:403-9
37. Trueb RM. Oxydative stress in aging of hair.Int J Trichology 2009; 1(1): 6-14
38. Wacker WE. Man: sapient but gouty. N Engl J Med 1970; 283(3): 151-2
39. Walker PLC, Corrigan A, Arenas M, Escudero E, Fairbanks L, Marinaki A. Purine-nucleoside phosphorylase deficiency, a mutation update. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 2011; 50:1243-1247
40. Watanabe S, Kang D-H, Feng L, Nakagawa T, Kanellis J, Lan H et al. Uric acid, hominoid evolution and the pathogenesis of salt-sensitivity. Hypertension 2001; 40:355-60
41. Wen CP, David Cheng TY, Chan HT, Tsai MK, Cheng WS, Tsai SP et al. Is high serum uric acid a risk marker or a target for treatment? Am J Kidney Diseases 2010; 56: 273-88
42. White A, Handler P, Smith EL. Principles of Biochemistry Fifth Edition in McGraw- Hill Book Company New York, London, Sydney, Toronto 1973: 373-411
43. Wu XW, Muzny DM, Lee CC, Caskey CT. Two independent mutational events in the loss of urate oxydase during hominoid evolution. J Mol Evol 1992; 34:78-84
44. Wyngaarden JB, Kelley WN. Gout in Stanbury, Wyngaarden and Frederickson (editors). The metabolic basis of inherited disease. McGraw Hill New York 1978; 916-1010
45. Yu K-H, Kuo C-F, Luo S-F, See L-C, Chang HS, Chiou M-J. Risk of end – stage renal disease associated with gout: a nationwide population study. Arthritis research and Therapy 2012; 14:R83
46. Zdrengea D, Marta D, Constantinescu M, Cucuianu M. Behavior of uricemia in hyperlipoproteinemic patients. Rev Roum Med Int 1980;18(4): 385-90
47. Zilva JF, Pannall PR. Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment. Lloyd- Luke (medical Books) LTD London 1972.



23

Aspecte paraclinice și metabolice în proliferările maligne

Alina Mărginean, Minodora Dobreanu

23.1 INTRODUCERE

Astăzi cancerul reprezintă a doua cauză de mortalitate în țările industrializate (reprezentând 12% din totalul deceselor de pe glob), după patologia cardiovasculară. În fiecare an, peste șase milioane de persoane mor datorită patologiei tumorale și se descoperă peste zece milioane de noi cazuri de cancer. În ciuda eforturilor științifice în sensul diagnosticului precoce și terapiei curative, o treime din cazurile de cancer nu pot fi diagnosticate și tratate în timp util. Prognosticul OMS pentru următorii 20 de ani este pesimist: peste 10 milioane de decese și peste 15 milioane de cazuri noi anual. Momentul descoperirii unui neoplasm are un impact major asupra ratei de supraviețuire în cancer.

Celulele din structura organismelor animale și vegetale se divid și asigură creșterea și dezvoltarea organismului ca întreg, precum și repararea sau înlocuirea celulelor îmbolnăvite sau moarte. Diviziunea și creșterea celulară sunt controlate prin intermediul ADN-ului din nucleu. Acest proces, se află în mod normal într-un echilibru desăvârșit, care dacă este modificat la nivelul uneia sau mai multor celule, proliferarea celulară degenerază și apare cancerul. Masa de celule tumorale va afecta invariabil celelalte celule ale organismului, țesuturile și chiar organele din jurul lor sau în anumite cazuri, organe aflate la distanță. În mod normal diviziunea unei celule sau a unui grup de celule se oprește atunci când nevoile organismului au fost îndeplinite. Acest control este pierdut în cazul proliferărilor maligne deoarece substratul genetic răspunzător de procesul creșterii și diferențierii celulare este modificat. În prezent se știe că toți factorii răspunzători de apariția cancerului, alterează direct sau indirect, genele implicate în diviziunea celulară.

În organismele sănătoase celulele proliferază într-o manieră controlată. Acest control este exercitat prin intermediul unor gene care, în funcție de nevoile organismului, comandă diviziunea celulară, diferențierea, creșterea sau apoptoza celulară. Acest echilibru dinamic între stimularea și supresia proliferării celulare este guvernat de două tipuri de gene:

- Promotoare, care se numesc și *proto-oncogene*. Acestea răspund la semnalele de creștere și acționează ca reglatori pozitivi ai proliferării celulare în *prezența unor factori de creștere* (sau semnale de creștere) eliberate în funcție de nevoile organismului.

- Supresoare (*tumour suppressors*), care acționează ca inhibitori ai proliferării. Mutațiile acestora au ca rezultat proliferarea celulară necontrolată. Uneori supresia este de fapt consecința absenței elementului activator.

În cazul proliferărilor maligne genele promotoare au suferit diverse mutații (devin ONCO-GENE - gene cauzatoare de cancer/gene proliferatoare mutante) și stimulează proliferarea celulară chiar și în lipsa semnalelor de creștere (Figura 23.1).

Ciclul celular este procesul complex prin care o celulă își dublează conținutul și se divide (Figura 23.2). Acesta constă din patru faze: G1 (creștere și metabolism normal), S (replicarea ADN), G2 (creștere și pregătire pentru mitoză) și faza M (mitoza). La acestea se adaugă faza G0 care este considerată o stare temporară de repaus în care celula a părăsit ciclul și nu se mai divide.

Factorii de creștere au rolul de a accelera creșterea și diviziunea celulară. Aceștia se comportă ca și molecule semnal și de obicei sunt citokine sau hormoni polipeptidici (peste 50 cunoscuți în prezent). Răspunsul celular la fixarea factorilor de creștere pe receptorii membranari constă în:

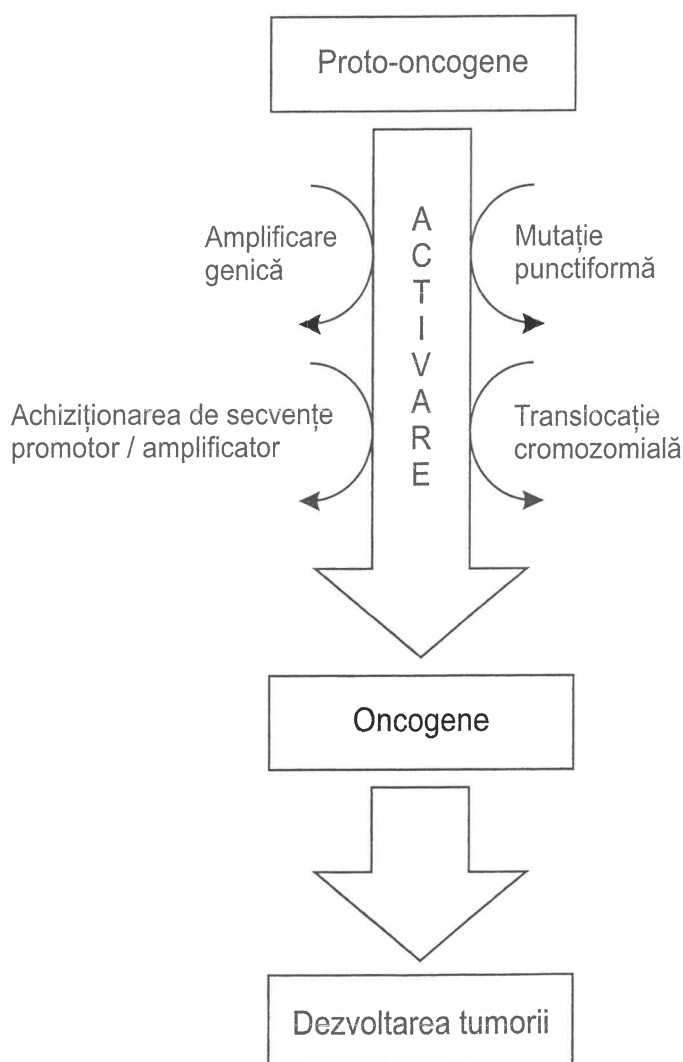


Figura 23.1 Mecanisme genetice implicate în apariția tumorilor

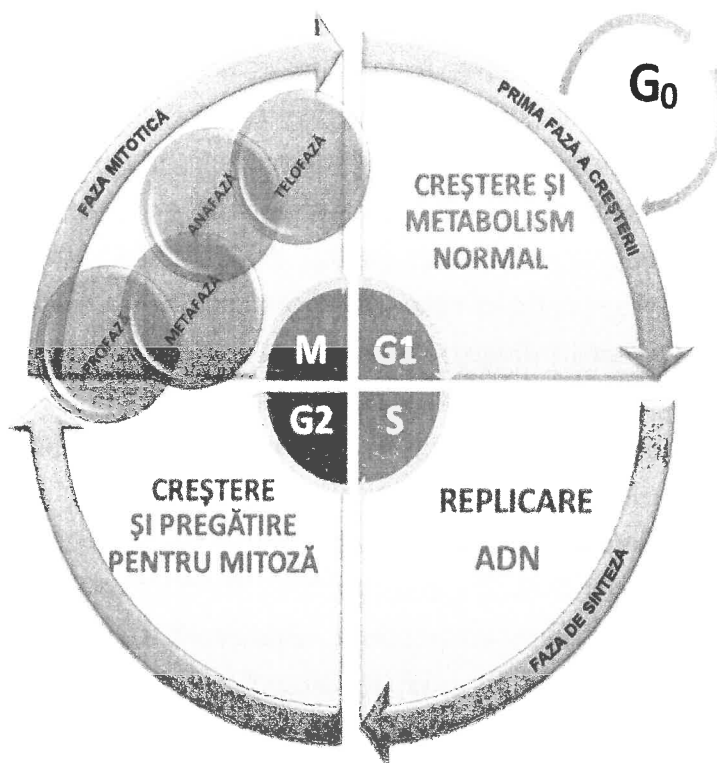


Figura 23.2 Etapele ciclului celular

- Creșterea concentrației calciului intracelular (vezi și 18.3.2);
- Reorganizarea fibrelor de actină;
- Activarea factorilor de transcripție sau translocarea acestora în nucleu;
- Sinteza ADN și diviziunea celulară.

Receptorii membranari ai factorilor de creștere sunt proteine transmembranare cu domenii citoplasmice tirozin-kinazice (vezi și 18.3.3.4).

Unul dintre cei mai importanți factori de creștere care acționează prin intermediul sistemului tirozin-kinazei este *factorul de creștere derivat din trombocite* (platelet-derived growth factor - PDGF). Acesta reglează creșterea și diviziunea celulară și are un rol important în angiogeneză. Efectele sale se manifestă prin intermediul unui receptor tirozin-kinazic (PDGFR). După legarea PDGF, acest receptor dimerizează și se activează printr-un proces de autofosforilare. Acest proces are rolul de a media legarea unor cofactori și de a activa unele căi de conducere cum ar fi calea PI3K (fosfatidilinozitol-3-kinaza) cu un rol important în migrarea celulară.

Apoptoza este moartea celulară programată. O serie de evenimente biochimice duc la apariția unor modificări celulare caracteristice cum ar fi: micșorarea celulei, condensarea cromatinei, fragmentarea ADN-ului și a nucleului, modificări care au ca și consecință moartea celulei. Un rol important în apoptoză îl au *caspazele* (proteaze cisteinice care degradează organele celulare) și Bcl-2 (genă care codifică sinteza unor proteine care reglează permeabilitatea membranei mitocondriale externe și exercită un efect anti-apoptotic).

Reglarea ciclului celular se realizează prin intermediul: ciclinelor, factorilor de creștere mitogenici și a proteinei p53.

P53 este o proteină supresoare tumorală, prin care celula monitorizează apariția unor leziuni ale ADN-lui pe parcursul ciclului celular. Această proteină poate frâna ciclul celular (în fazele G1-S) pentru a permite repararea leziunilor minore ale ADN-ului, prin inducerea sintezei unor inhibitori ai CDKs (Cyclin – dependent kinases): p15, p16, p21, p27. Dacă leziunile ADN sunt majore/ ireparabile cu potențial mutagen, p53 declanșează apoptoza celulei.

30% dintre celulele tumorale au o genă mutantă activă a unui element semnalizator Ras, care acționează ca un întrerupător molecular în transducția unor elemente cheie pentru creșterea și diferențierea celulară. Ras este o GTP-ază, care evoluează între două forme: Ras-GTP (activă) și Ras – GDP (inactivă). Una dintre cele mai importante funcții ale Ras este aceea de a regla cascada MAPK (Mitogen - Activated Protein Kinase), implicată în fosforilarea unor factori de transcriere nucleari importanți în sinteza ADN și diviziunea celulară.

În cazul mutantelor Ras, activarea se poate produce în lipsa semnalelor extracelulare, ceea ce poate constitui elementul inițiator al unui proces malign.

Protein-kinaza mitogen-activată (mitogen-activated protein kinase - MAPK) este o protein-kinază serin/treonin-specifică capabilă să răspundă la o serie de stimuli extracelulari (factori mitogeni, stres osmotic, șoc termic și citokine proinflamatoare) și să regleze expresia genică, mitoză, diferențierea celulară, proliferarea sau apoptoza. Medicamente care induc fenomenul de down-regulation pe MAPK ar putea fi folosite pentru tratamentul afecțiunilor maligne.

Kinaza Janus (JAK) este o tirozin-kinază intracelulară cu rol în transmiterea semnalelor mediate de citokine. După legarea citokinelor la receptorii lor, JAK se activează și fosforilează acești receptori făcând posibilă acțiunea unor molecule semnal din familia de traducători ai semnalelor și activatori ai transcripției (STAT – *signal transducer and activator of transcription*).

Cancerul apare atunci când se modifică starea de echilibru dintre acțiunea oncogenelor și cea a genelor supresoare tumorale. Printre cele mai frecvent întâlnite în cadrul afecțiunilor maligne se găsesc oncogenele Myc și Ras. Gena Myc codifică un factor de transcripție răspunzător de reglarea expresiei a 15% din genotip. O variantă mutantă a Myc se găsește în numeroase tipuri de cancer și duce la exprimarea necontrolată a multor gene implicate în proliferarea celulară. Genele supresoare tumorale și proteinele codificate de acestea au un efect inhibitor asupra ciclului celular sau induc apoptoza după următorul algoritm: a) represia genică; b) decuplarea ciclului celular în cazul leziunilor ADN-ului; c) dacă leziunile ADN nu pot fi remediate se inițiază apoptoza; d) împiedicarea metastazării celulelor tumorale prin acțiunea proteinelor de adeziune celulară.

23.2 TRANSFORMĂRI METABOLICE ÎN CELULELE MALIGNE

Este unanim acceptat faptul că cercetările conduse de Otto Warburg și publicate în 1926 au stabilit noi direcții în studiul metabolismului celulelor tumorale. Un interes crescut pentru necesitățile energetice și metabolismul intermediar al celulelor neoplazice se observă și astăzi, când comunitatea științifică are la dispoziție metode noi și mult mai evolute de analiză.

Pentru a înțelege transformările metabolice ale celulelor tumorale trebuie să punctăm următoarele:

- Celulele tumorale derivă din celule normale care au suferit modificări genetice, rezultând un fenotip neoplazic dotat cu potențial malign;
- Pentru a-și manifesta malignitatea celulele neoplazice vor avea metabolismul modificat în concordanță cu necesitățile bioenergetice și de sinteză;
- Celulele maligne au un comportament de tip *parazitar*: acestea au numai funcțiile necesare propagării celulare, care se desfășoară în detrimentul gazdei.

S-a observat că mediul în care se produce proliferarea celulară necontrolată influențează metabolismul celular. Un rol important îl are cantitatea de oxigen și de micronutrienți livrate de circulația sanguină. Astfel în cadrul unei mase tumorale se vor întâlni invariabil populații de celule ce au la dispoziție o cantitate progresiv mai mică de oxigen, de la normoxie până la hipoxie și chiar anoxie. De aceea, metabolismul celulelor se modifică continuu în concordanță cu accesul lor la oxigen. Cu cât mediul devine mai hipoxic proliferarea va fi compromisă, deoarece majoritatea celulelor maligne au un metabolism aerob. De asemenea, pentru a putea elimina produșii de catabolism celulele neoplazice trebuie să aibă acces la circulația sanguină. Celulele maligne pot induce fenomenul de *up-regulation* pentru anumiți factori sintetizați de organism în condiții de hipoxie, stimulând angiogeneza și asigurându-și astfel condițiile necesare pentru proliferare. De multe ori, pentru a-și continua existența parazitară, unele celule părăsesc locul unde s-au dezvoltat inițial, în căutarea unui alt mediu propice pentru desfășurarea activității tumorale (fenomen numit metastazare).

Trecerea de la metabolismul *funcțional* al celulei normale spre un metabolism bazat pe lipogeneză/ colesterogeneză de novo este una din cele mai importante modificări constatate la celulele neoplazice. Necesitatea lipogenezei /colesterogenezei de novo este comună tuturor celulelor maligne; acești compuși sunt folosiți în procesul de membranogeneză, etapă necesară în proliferarea celulară. Lipogeneza depinde de cantitatea de acetil CoA (acetil coenzima A) prezentă în citosol. Aceasta reprezintă materia primă pentru scheletul de carbon al acizilor grași și lanosterolului (intermediar în colesterologeneză). La mamifere sursa majoră de Acetil CoA citosolică provine din producția mitocondrială de citrat care este transportat în citosol prin intermediul unei proteine transportoare (*citrate transporter protein* - CTP) (Figura 23.3). În mod normal expresia genei care controlează sinteza acestui transportor este scăzută deoarece citratul este reținut în mitocondrie și oxidat în cadrul *ciclului Krebs* pentru a obține energie și metaboliți intermediari necesari altor căi metabolice. Celulele maligne induc *up-regulation* pentru CTP ceea ce permite transportul citratului în citosol, unde este apoi transformat în Acetil CoA și oxalacetat sub acțiunea citrat-liazei ATP-dependente. În același timp o parte a citratului este oxidat pe calea ciclului Krebs.

23.3 DIAGNOSTICUL PRECOCE AL PROLIFERĂRILOR MALIGNE

În vederea diagnosticării timpurii a proliferărilor maligne au fost propuse o serie de teste și investigații paraclinice. Astfel de exemple sunt: mamografia pentru detectarea cancerului de

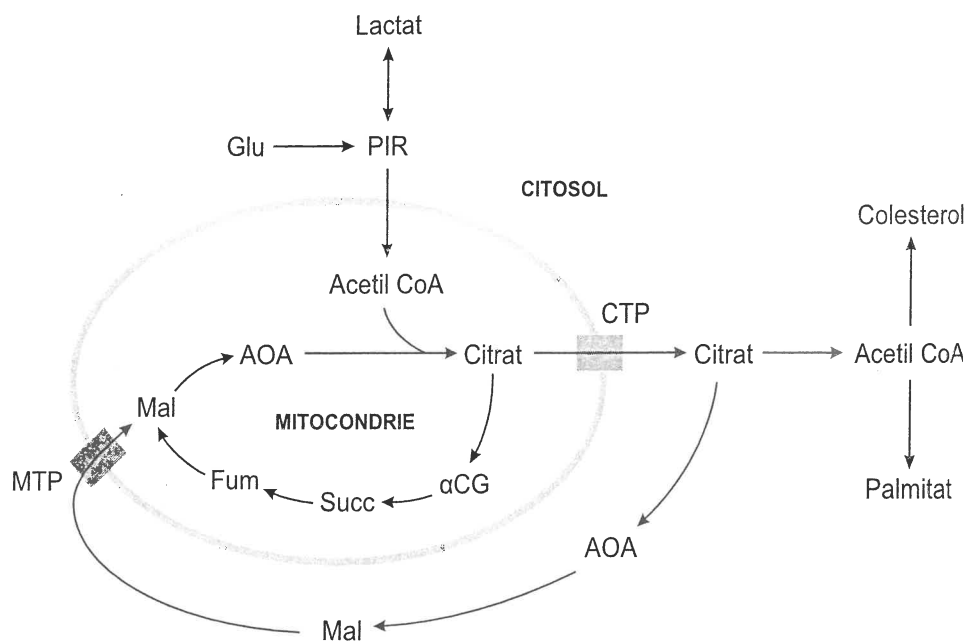


Figura 23.3 Orientarea metabolismului celular tumoral spre sinteza de lipide

sân, testele pentru sângeri oculte și colonoscopia pentru cancerul colorectal, tușeul rectal și PSA pentru cancerul de prostată sau frotiul Papanicolaou pentru diagnosticul precoce al cancerului de col uterin.

O serie de teste efectuate din serul pacienților sau din alte produse biologice, se bazează pe proprietatea țesutului tumoral de a produce diverse substanțe care ajung în circulația sanguină sistemică. Aceste substanțe poartă numele de markeri tumorali (sau *biomarkeri*).

Markerul tumoral este o substanță produsă de către un țesut tumoral, exprimată în/pe celula producătoare (markeri celulari) sau secretată în umorile înconjurătoare (markeri umorali/solubili în lichide biologice). O gamă largă de molecule pot fi clasificate ca markeri tumorali: enzime, hormoni, antigene oncofetale, carbohidrați, antigene de grup sanguin, proteine, receptori, gene sau produșii unor gene. În 1847 a fost descoperit primul marker de acest fel prin precipitarea unei proteine în urina încălzită și acidifiată care a primit numele de *proteină Bence-Jones*. Ulterior s-a demonstrat că aceasta reprezintă lanțul ușor, monoclonal, al imunoglobulinelor secretate de plasmocitele maligne. În prezent proteinuria Bence-Jones este folosită pentru diagnosticul mielomului multiplu.

În 1960 a fost introdusă tehnica radioimună, iar după 1970 dezvoltarea acesteia a atras după sine o îmbunătățire în determinarea biomarkerilor precum și descoperirea unor noi molecule implicate în procesul carcinogenetic. Ulterior descoperirea anticorpilor monoclonali a dus la creșterea specificității și sensibilității determinărilor. Un exemplu în acest sens este descoperirea cu ajutorul anticorpilor monoclonali a unor antigene de suprafață cum sunt CA125 și CA15-3. Acestea fac parte din clasa carbohidraților și au o sensibilitate semnificativ mai mare în comparație cu antigenele oncofetale (CEA – antigenul carcino embrionar). Mai recent, studii referitoare la oncogene și gene supresoare tumorale, precum și dezvoltarea tehnicilor de biologie moleculară (tehnica ADN-ului recombinant, reacția de polimerizare

în lanț - PCR, secvențierea proteică automată) au dus la înțelegerea markerilor tumoralilor la nivel molecular. Noile metode de genomică și proteomică (desorbție/ ionizare laser cu asistare matriceală – MALDI; cel mai adesea în combinație cu această tehnică este folosit spectrometrul de masă) vor schimba modul de măsurare și vor ajuta la descoperirea unor noi markeri tumoralilor.

23.3.1 UTILIZARE CLINICĂ

Pentru ca markerii tumoralilor să fie de utilitate clinică, măsurarea în laborator a acestora trebuie să fie clar distinctă de posibilitatea de detectare la pacienți care nu au tumora. Putem spune despre markerul tumoral că acesta trebuie să fie sensibil, cu alte cuvinte nivelele crescute trebuie să indice prezența tumorii. Markerul trebuie să fie și specific, adică nu trebuie să găsim valori crescute dacă tumora nu este prezentă.

Screening-ul. Utilizarea markerilor tumoralilor în scop de screening este de mare importanță medicală. Din păcate însă, foarte puțini markeri sunt suficient de sensibili sau specifici pentru a putea fi utilizați în acest scop.

Diagnosticul cancerului. Un al doilea scop în care sunt utilizați markerii tumoralilor este acela de diagnostic al tumorilor. La pacienți cu semne sau simptome clinice, determinarea unui marker plasmatic sau urinar cu specificitate înaltă este frecvent utilizată pentru a confirma diagnosticul. Un astfel de caz este dozarea în urină a acidului 5-hidroxiindolacetic (5-HIAA) în sindroamele carcinoide sau a PSA în tumorile prostatei.

Stabilirea prognosticului bolii canceroase. În unele cazuri, concentrația markerului specific este în strânsă relație cu masa țesutului tumoral.

Monitorizarea răspunsului la tratament. Dozarea în cinetică a unui marker tumoral oarecare înainte și după tratamentul chirurgical, chimioterapie sau radioterapie poate fi utilă pentru a determina răspunsul la tratament.

Identificarea recurențelor. În situația în care markerul de interes a avut preterapeutic o concentrație crescută, valorile intermitent crescute după terapia chirurgicală, chimioterapie sau radioterapie, în timpul așa-numitei remisii, pot indica prezența unei recăderi. Uneori însă, tumorile pot să nu mai exprime markerul tumoral, în ciuda faptului că ele cresc în dimensiune și metastazează.

23.3.2 Clasificarea markerilor tumoralilor după forma antigenelor tumorale

- TSA-Tissue Specific Antigen - Antigene care aparțin doar celulelor tumorale
- TAA-Tissue Associated Antigen - Antigene care aparțin și celulelor normale

Deși nu toate celule neoplazice dispun de markeri deosebiți de cei fiziologici, la majoritatea pot fi identificate structuri antigenice diferite, numite neoantigene. Aceste structuri pot fi clasificate în următoarele 2 grupe:

1. Antigenele **retrogenetice**: în condiții fiziologice ele sunt exprimate exclusiv pe suprafața celulelor embrionare, dar nu și a celor de după naștere. Din această cauză se numesc și antigene oncofetale. În această grupă intră: α -fetoproteina (AFP) și antigenul carcinoembri-

onar (CEA), care pot reapare după naștere în caz de neoplazii hepatice primitive, intestinale, pancreatice dar și pulmonare.

2. Antigenele **de diferențiere**: apar numai într-o fază determinată a maturăției sau diferențierii unor serii celulare (ca în cazul elementelor imature din leucemii sau limfoame).

Antigene onco-fetale. Sunt exprimate fiziologic în viața intrauterină (între lunile 2-6 de sarcină, în intestinul, ficatul, pancreasul fătului), reapar la adult:

- CEA - exprimat atât pe celule cât și în fluidul extracelular, în multe tumori ale tractului digestiv (cancer de colon, pancreatic și hepatic) dar și în cel mamar sau al vezicii urinare;
- AFP - în viața intrauterină este secretată de sacul vitelin și ficatul fetal; reapare în serul bolnavilor cu tumori hepatice, dar și în afecțiuni non-neoplazice (ciroza hepatică, inflamații cronice ale tractului digestiv); concentrația AFP este utilizată pentru monitorizarea evoluției postoperatorii a tumorii sau a tratamentului medicamentos.

Antigene de diferențiere celulară: pe parcursul diferențierii celulare normale, în diverse stadii se exprimă diverse antigene de suprafață, care pot fi detectate și pe suprafața celulelor tumorale. Tehnicile de diagnostic care utilizează anticorpi monoclonali specifici permit evidențierea celulelor tumorale și a stadiului în care a survenit transformarea malignă.

Pentru leucemii acute:

- LLA: CD10 (CALLA - *common acute lymphoblastic leukemia antigen*) - forma comună; CD19, TdT(n) *- forma null
- LLA cu preB: CD19, lanțuri μ libere intracitoplasmatic
- LLA cu T: CD3 (citoplasmatic), CD7, TdT(n)
- LMA: CD13, CD33, mieloperoxidaza

Pentru leucemii cronice:

- LLC cu B: CD19, CD21, CD5, CD23

Sindromul Sezary: CD3, CD4

- LLC cu T: CD3, CD8

Markerii tumorali umorali/solubili pot fi clasificați în două grupe principale:

- substanțe inactive biologic, care pot fi detectate și analizate în plasmă/ser sau urină și sunt utilizate ca markeri pentru prezența afecțiunii maligne, purtând denumirea de „markeri tumorali”.
- substanțe care alterează metabolismul și în mod normal produc efecte clinice numite sindroame paraneoplazice; acestea sunt denumite cel mai adesea „produși hormonal”.

23.4. PEPTIDE NON-HORMONALE CA ȘI INDICATORI DE MALIGNITATE - MARKERI TUMORALI

Termenul de „marker tumoral” este actualmente utilizat într-un mod mult mai restrâns pentru a indica o substanță care este sintetizată de către o tumoră și eliminată în sânge sau urină, unde poate fi determinată. (Tabelul 23.I și Tabelul 23.II).

Tabelul 23.1 Markerii tumorali aprobați de FDA – 2008

Compusul analizat	Tumora asociată	Indicații
SER / PLASMĂ		
CA15-3, CA27.29	mamară	monitorizare; recurențe
HER-2 (human epidermal growth factor receptor)	mamară	monitorizare
Celule tumorale circulante	mamară	prognostic în boala metastatică
CA125	ovariană	monitorizare; evaluare secunda
CA72-4	gastro-intestinale	monitorizare
CA19-9	pancreatică	monitorizare
PSA total; PSA complexat	de prostată	diagnostic la bărbați peste 50 ani coroborat cu tușeu anal; monitorizare; prognostic
PSA liber	de prostată	diagnostic diferențial între tumora malignă și benignă la bărbați peste 50 ani, cu PSA total între 4-10 ng/mL și tușeu anal nesugestiv
Fosfataza acida prostatică	de prostată	monitorizare
CEA (antigen carcino-embriionar)	colorectală; mamară; pulmonară	monitorizare; prognostic
AFP (alfa-fetoproteina)	testiculară ne-seminală	monitorizare
AFP-L3	hepatocelulară	evaluarea riscului
Des-γ-carboxi protrombina	hepatocelulară	evaluarea riscului
Tireoglobulina	tiroidiană	monitorizare (la pacienții fără autoanticorpi anti-tireoglobulină)
Soluble mesothelin-related peptides	mezoteliom	monitorizare
URINĂ		
BTA stat, BTA TRAK (bladder tumor antigen)	de vezică urinară	managementul tumorii, coroborat cu cistoscopia
NMP-22 (nuclear matrix protein)	de vezică urinară	diagnosticul la pacienții simptomatici sau cu factori de risc; recurențe
Tumor cell markers (ImmunoCyt)	de vezică urinară	managementul tumorii, coroborat cu citologia urinii și cistoscopie
TESUTURI		
Receptori de estrogen și progesteron	mamar	evaluarea probabilității unui răspuns favorabil la tratament; prognostic; management
HER-2	mamar	identifică pacienții eligibili pentru tratament cu trastuzumab (Herceptin)
EGFR (epidermal growth factor receptor)	colorectal	identifică pacienții eligibili pentru tratamentul cu cetuximab
TPA (antigen polipeptidic tisular)	antigen universal asociat tumorilor	indică activitatea actuală a tumorii

Tabelul 23.II Markeri tumorali – tabel sinoptic

ȚESUT	TUMORĂ ASOCIATĂ	MARKER TUMORAL	DETERMINĂRI SUPLIMENTARE
SÂNGE SISTEM LIMFATIC	leucemie	Neprilizina (CD10 sau CALLA), imunoglobulina monoclonală, TK, proteina Bence-Jones	TdT(n), β 2-mg, feritina
	limfosarcom	CD3, CD79a, vimentina	
	cancer tiroidian	Tireoglobulina, calcitonina, CEA, NSE	TPA
	tumoră corticosuprarenală	cortizol	Testosteron, estrogen
SISTEM ENDOCRIN	feocromocitom	normetanefrina, epinefrina, norepinefrina, enolaza 2	AVM (acid vanil mandelic), HVA (acid homovanilic)
	tumori neuroendocrine	sinaptofizina, cromogranina A, serotonina	acid 5-OH-indol acetic (5-HIAA)
	neuroblastom	HVA, dopamina, NSE	AVM
	tumoră hipofizară	HCG, ACTH, prolactina	FSH, LH, TSE
SISTEM NERVOS	tumoră cerebrală	PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)	NSE
	astrocitom	GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)	
	melanom	proteina S-100, MDGRP (Melanoma-derived growth regulatory protein), melanina, feritina, HVA	acid N-acetil-neur- aminic (NANA)
SISTEM RESPIRATOR CARDIOVASCULAR	cancer pulmonar	CEA, enolaza 2, factorul motilității autocrine / GDI, NSE, TPA, CA 72-4	calcitonina, ACTH, fer- itina, prolactina, CRP
	hemangiosarcom	factorul VIII al coagulării	
	tumoră de esofag	SCC, CEA	CA 19-9
	tumoră gastrică	CA 72-4, CA 19-9, CEA, TPA	gastrina, feritina, prolactina
APARAT DIGESTIV	cancer colorectal	CA19-9, CEA, TPA	CA-125, CRP, NANA
	tumoră pancreatică	CA19-9, CEA, CA 242, CA 72-4, TPA	gastrina, glucagon
	carcinom hepatocelular	AFP, AFP-L3, CEA, CA-125	CA 19-9, feritina, enzime hepatice
	gastrinom	gastrina	
	glucagonom	glucagon	
	insulinom	insulina	peptidul C
	tumoră de col / corp uterin	CA 125, CEA, TPA, CA 19-9	HCG, CRP
	tumoră ovariană	CA 125, CD30, hCG, AFP, LDH, inhibina, CA 72-4, CA 19-9, TPA, CEA	HCG, AFP, CRP, progesteron
APARAT REPRODUCATOR URINAR GLANDE MAMARE	cancer testicular	β hCG, AFP/AFP-L3 • CD30	NSE
	cancer de prostată	PSA, fosfataza prostatică acidă, glutamat-carboxipeptidaza II, receptorul erbB-3, EPCA-2 (antigenul precoce al cancerului de prostată 2), GOLPH2 (Golgi membrane phosphoprotein), PCA3 (Prostate cancer antigen), PAP	CEA, TPA, feritina
	tumora cu celule germinale	NANOG, AFP, HCG / β HCG	HPL, progesteron, feritina, CEA, TPA, prolactina, estradiol
	cancer renal	eritropoietina, renina	CEA, TPA
	cancerul vezicii urinare	receptorul erbB-3, NMP22	CRP
	tumoră mamară	CA 15-3, receptorul erbB-2, receptorul erbB-3, catepsina D, CEA, TPA	feritina, HCG, CRP, IgE
TUMORILE CAPULUI ȘI GÂTULUI	carcinoame ale capului și gâtului	CEA, TPA	IgE, feritina, NANA
MUSCULO- SCHELETAL	rabdomiosarcom	desmina	
SISTEMUL OSTEO-ARTICULAR	sarcom osteo-articular	izoenzima AP, hidroxiprolina, TPA, CEA	PTH
HISTOLOGIE GENERALĂ	sarcom	vimentina	
	carcinom (epitelial)	citokeratina	

Markerii care sunt denumiți curent antigene tumorale sunt de fapt antigene asociate tumorilor. Această denumire este inexactă pentru că sunt antigene care intră în reacție de fapt cu anticorpi provenind de la animale imunizate cu aceste antigene. Sunt cei mai specifici dintre markerii utilizați în prezent pentru detectarea neoplaziilor. Cu tehnica anticorpilor monoclonali pot fi determinate noi antigene și astfel acest grup devine tot mai numeros.

23.4.1 Antigenul carcino-embrionar (CEA)

Este o glicoproteină cu o greutate moleculară de 180 kDa; 45-60% din moleculă este alcătuită din carbohidrați, iar partea proteică este un lanț polipeptidic. S-au descris cel puțin 6 epitopi. Heterogenitatea biochimică este cauzată de conținutul variabil în glucide. CEA a fost identificat în 1965 de Phil Gold și Samuel O. Freedman într-un extras tisular de tumoră de colon. Gena responsabilă pentru sinteza CEA a fost identificată în 1986 pe cromozomul 19 și ulterior a putut fi clonată. La om această genă se transcrie sub forma unui ARNm de 3100 de baze care este translatat pentru a sintetiza o proteină cu greutatea de 70 kDa. Prin glicozilare se ajunge la greutatea totală de 180 kDa. Structura proteică include un domeniu N-terminal, o regiune hidrofobă C-terminală și trei domenii identice de 178 de aminoacizi legate prin punți disulfidice. Această structură încadrează CEA în superfamilia imunoglobulinelor.

CEA se diferențiază de ceilalți membrii ai familiei din care face parte prin faptul că folosește o fracțiune a glicozil fosfatidilinozitol-ului pentru a se atașa de membrana celulară.

În timpul dezvoltării embrionului, se formează în pancreas și în tractul gastrointestinal ca un antigen de suprafață celulară. La adult, sinteza nu încetează complet.

Valori normale: 0-4,6 ng/mL.

Timpul de înjumătățire în ser: 1-2 săptămâni.

Fumători: < 10 ng/mL.

CEA este produs în anumite tumori maligne, în special în carcinoamele colo-rectale. Totuși, trebuie spus că nivele crescute au fost depistate și într-o varietate mare de afecțiuni non-maligne, cum ar fi afecțiuni inflamatorii ale peretelui intestinal, hepatită, pancreatită, ciroză alcoolică, insuficiență renală, bronșită și chiar la fumători. În ciuda nespecificității acestuia, dacă concentrația inițială plasmatică este crescută, dozări seriate pot fi utilizate pentru a estima eficiența terapiei. Concentrația plasmatică a markerului se corelează destul de slab cu masa tumorală; totuși, concentrații foarte crescute indică de obicei o prognoză rezervată.

Valori crescute se întâlnesc în carcinom colo-rectal, pancreatic, gastric, pulmonar, mamar, cervical, ovarian. În bolile benigne și la fumători valorile CEA nu depășesc 10 ng/mL în 80% din cazuri.

Preoperator, valorile CEA în ser au o valoare diagnostică limitată (Tabelul 23.III).

- sub 10 ng/mL: nu are specificitate din cauza interferenței cu bolile non-maligne.
- intervalul 10-20 ng/mL: există riscul unui proces malign
- peste 20 ng/mL: indică cu o mare probabilitate un proces malign.

CEA nu este capabil să localizeze exact tumora. Sensibilitatea scade în următoarea ordine: carcinom colo-rectal, pancreatic, pulmonar, mamar, alte tumori gastrointestinale, ginecologice, tiroidiene.

Prezența în urină a unei concentrații de peste 35 ng/mL (dacă infecția urinară este exclusă) poate indica un carcinom al vezicii urinare. Tumorile colonului, prostatei, rinichilor se însoțesc de valori crescute de CEA în urină numai după invadarea tractului urinar.

Valori crescute de CEA în lichidul cefalorahidian apar în primul rând în metastaze cerebrale. Persistența valorilor patologice postoperator indică o tumoră reziduală. Normalizarea valorilor după operație, urmată după o scurtă perioadă de timp de o creștere rapidă a valorilor indică prezența metastazei (Tabelul 23.IV).

Antigenul carcino-embrionar exprimat pe suprafața celulelor neoplazice este considerat unul din factorii care precipită apariția determinărilor secundare hepatice în cazul tumorilor colorectale, probabil datorită rolului în adeziunea celulară deținut de CEA.

Inițial, anticorpii monoclonali direcționați împotriva CEA au fost concepuți în scop diagnostic, pentru realizarea colorației imunohistochimice a specimenelor tisulare prelevate. Astăzi se folosește arcitumomab-ul - fragmentul Fab' al anticorpului monoclonal IgG1 (IMMU-4) murin - un anticorp monoclonal, pentru depistarea structurilor anatomice cu concentrații ridicate de CEA. Cuplarea acestor anticorpi cu un izotop radioactiv au făcut posibilă localizarea celulelor tumorale *in vivo*. Atașarea unor molecule citotoxice cum sunt radionuclizii, toxinele

Tabelul 23.III Sensibilitatea CEA în tumorile primare

Tumori primare	Sensibilitate (%)
Carcinom pulmonar cu celule mici	60-70
Carcinoame pulmonare altele decât cele cu celule mici	75-85
Cancer mamar preoperator	40-95
Cancer mamar postoperator	75-85
Ficat	30-40
Pancreas	30-40
Carcinom colo-rectal preoperator	10-85
Carcinom colo-rectal postoperator	65-75
Vezică urinară	<10
Prostată	<10
Ovar	20-30
Tiroidă	<10
Cap, gât	60-80

Tabelul 23.IV Sensibilitatea CEA în metastaze

Locul metastazei	Sensibilitate (%)
Multiple	87
Ficat	71
Oase	57
Plămâni	56
Peritoneu	33
Sistem limfatic	11

sau agenții chimioterapici au deschis o nouă eră în tratamentul cancerului – terapia țintită. În prezent noile cercetări de biologie moleculară și imunologie au propus utilizarea acestui marker tumoral ca țintă în vederea dezvoltării unor vaccinuri și chiar ca țintă propriu-zisă în vederea limitării metastazării celulelor neoplazice.

23.4.2 ALFA-FETOPROTEINA (AFP)

Este o glicoproteină cu masa moleculară 70 kDa (conține 4% carbohidrați) de origine oncofetală, sinteza ei fiind suprimată la adult. Gena codificatoare a acestei proteine este localizată pe cromozomul 4. Este considerată proteina omoloagă albuminei serice în sângele fetal. AFP nu are nici o funcție cunoscută la adult. În cursul vieții intrauterine se formează în sacul vitelin, iar mai târziu în ficat. În ficatul fătului sinteza maximă are loc în săptămânile 14-20. De aici ajunge în serul mamei și atinge concentrația maximă în săptămânile 35-38 de sarcină.

Raportul normal al concentrației de AFP în serul fetal : lichidul amniotic: serul matern este de 10.000 : 100 : 1. Devierile de la aceste valori indică o sarcină patologică.

Acest marker poate fi determinat din sângele sau lichidul amniotic al pacientelor însărcinate pentru screening-ul anomaliilor de dezvoltare intrauterină a fătului. Valori crescute se întâlnesc în defectele de închidere a tubului neural și în omfalocel iar scăzute în sindromul Down.

Valori normale: < 10 – 15 ng/mL

Concentrația AFP crește odată cu înaintarea în vârstă astfel încât, limita superioară a intervalului biologic de referință la persoanele < 40 de ani este 11,3 ng/mL iar la cele > 40 de ani 15,2 ng/mL.

La nou-născut AFP are valori foarte crescute. Concentrația acesteia scade progresiv ajungând la vârsta de 12 luni la valori de 10 - 12 ng/mL.

Timpul de înjumătățire: 5 zile.

Bolile maligne sau inflamatorii ale celulelor care în perioada embrionară au secretat AFP sunt însoțite de o sinteză crescută de AFP. Este vorba în primul rând de hepatocite (boli inflamatorii sau maligne ale ficatului) și de celule germinale (boli maligne).

Secreția AFP poate fi foarte crescută în plasma pacienților cu tumori hepatice, sau cu tumori cu celule germinale: carcinoamele hepatocelulare, hepatoamele primare, hepatoblastoamele și de asemenea în teratoame.

Creșteri moderate ale concentrației acesteia au fost observate în afecțiunile hepatice non-maligne, cum ar fi hepatitele acute și cronice precum și în ciroza hepatică. Așadar concentrații crescute ale acesteia nu sunt absolut specifice tumorilor hepatice, dar sunt sugestive.

AFP crește moderat în următoarele boli maligne: neoplazii testiculare, ovariene, retroperitoneale, mediastinale, în cancerul de stomac, de cai biliare precum și în cancerul pancreatic. (Tabelul 23.V).

În contextul medicinei bazate pe dovezi este confirmat faptul ca AFP este un marker valoros pentru pacienții cu tumori germinale non-seminomatoase.

O valoare a AFP aflata în limitele intervalului biologic de referință nu exclude o malignitate.

Tabelul 23.V Nivelul AFP în diverse afecțiuni tumorale și non-tumorale

AFP (ng/ml)	<10	10-215	215-7500	>7500
Persoane sănătoase	~100%			
Ciroza hepatică/hepatita	~80%	~15%	~5%	
Carcinoame extrahepatice cu metastaze hepatice	~65%	~30%	~5%	
Carcinoame primare hepatocelulare	~5%	~10%	~35%	~50%

23.4.3 DES-GAMMA CARBOXYI-PROTROMBINA (D γ CP)

Se mai numește PIVKA-II - "*protein induced by vitamin K absence or antagonist-II*" și este o formă patologică a protrombinei. În mod normal precursorii protrombinei suferă un proces de carboxilare posttranslațională la nivel hepatic înainte de a fi eliberați în plasmă. În cazul D γ CP acest lucru nu se întâmplă. Această proteină poate fi detectată la pacienți cu deficiență de vitamina K sau la cei aflați sub tratament cu warfarină (inhibitor al acțiunii vitaminei K). Prezența D γ CP a fost identificată la peste 90% din pacienții cu *carcinom hepatocelular* în timp ce pacienții cu alte afecțiuni hepatice nu prezintă nivele detectabile. Concentrația serică a D γ CP nu se modifică după administrarea de vitamina K, sugerând un defect de carboxilare și eliminând posibilitatea unei deficiențe de vitamina K. D γ CP poate fi folosită ca marker tumoral, având o sensibilitate și o specificitate înaltă pentru carcinomul hepatocelular. În același timp poate diferenția carcinomul hepatocelular de afecțiunile non-maligne ale ficatului.

Valori normale: 0,0 – 7,4 ng/mL

23.4.4 ANTIGENUL GASTRO-INTESTINAL CA19-9

Este un gangliosid (glicolipid) descoperit în 1981 la pacienți cu tumoră de colon și de pancreas. Este prezent numai la persoanele cu antigenele de grup sanguin Lewis prezente. Persoanele cu grup sanguin relativ rar Lewis-(a) Lewis-(b) (3-5% din populație) nu dispun de enzima sialyl-transferaza necesară pentru sinteza CA19-9. La aceste persoane CA19-9 rămâne la valori foarte scăzute chiar dacă este prezentă o neoplazie, markerul tumoral recomandat fiind CA50. CA19-9 este prezent în celulele epiteliale și mucoase din stomac, intestin, pancreas, ficat.

Valori normale: 0-37 U/mL.

Timp de înjumătățire: 4-6 zile.

Intervalul de graniță: 37-100 U/mL, poate fi întâlnit atât la persoane cu boli benigne, cât și cu boli maligne. La valori > 63 U/mL probabilitatea ca boala să fie de natură malignă este de 95%.

Deși CA19-9 are o sensibilitate mare în cazul carcinomului pancreatic, Societatea Americană de Oncologie Clinică nu recomandă întrebuințarea acestui biomarker pentru diagnosticul tumorilor pancreatice. Motivul este numărul mare de rezultate fals negative și fals pozitive. Principala întrebuințare recomandată pentru acest marker este verificarea eficacității tratamentului. Pentru aceasta se va verifica înaintea administrării tratamentului dacă tumora respectivă secretă acest marker. Apoi se va urmări nivelul acestuia pe tot parcursul trata-

mentului și după ce terapia antitumorală a fost oprită pentru a detecta o posibilă recurență. În alte boli maligne prezintă o sensibilitate mai scăzută (Tabelul 23. VI).

Specificitatea (Tabelul 23.VII) este însă semnificativ mai mare în comparație cu CEA.

CA19-9 este întâlnit și într-o serie de patologii non-tumorale cum ar fi sindromul Mirizzi (complicație rară a litiazei biliare, cu obstrucția căii biliare comune și semne clinice de icter obstructiv) și alte afecțiuni ale ductelor biliare și ale ficatului. Ca o curiozitate, în anul 2003 a fost prezentat cazul unei paciente în vârstă de 52 de ani care prezenta nivele crescute de CA 19-9 (1432 UI/mL) după ce consumase în ultimele luni aproximativ 1,5-2 L/zi de ceai negru. S-a prezentat la medic cu dureri epigastrice, anorexie și scădere ponderală. Examenul obiectiv și testele paraclinice nu au decelat modificări. După întreruperea consumului de ceai simptomele au dispărut, iar CA 19-9 a revenit la normal.

Un studiu realizat de o echipă de medici chinezi propune utilizarea CA19-9 pentru stabilirea operabilității neoplasmului pancreatic. La valori peste 353 U/mL tumora pancreatică s-a dovedit a fi inoperabilă (sensibilitate = 93,1% și specificitate = 78,3%). În același timp pentru pacienții cu cancer pancreatic metastazant, nivelul de CA 19-9 (alături de nivelul bilirubinei totale) poate fi folosit pentru a oferi un prognostic legat de supraviețuirea la un an.

23.4.5 ANTIGENUL GASTRO-INTESTINAL – CA 72-4

Este o glicoproteină cu masă moleculară de 400 kDa, prezentă în stomac, ovare, celule epiteliale pulmonare. A fost identificat folosind 2 anticorpi monoclonali (CC49, B72.3).

Valori normale: 0-8 ng/mL.

Timp de înjumătățire: 4-6 zile

Este indicat în carcinom colo-rectal, gastric, ovarian, endometrial, mamar și adenocarcinom pulmonar (Tabelul 23.VIII și 23.IX). În cancerul gastric are o sensibilitate și specificitate semnificativ mai mare decât CEA și CA19-9 (Tabel 23.X).

Există o corelație mai exactă între CA 72-4 și stadiile bolii, comparativ cu valorile CEA și CA19-9 (Tabelul 23.XI).

CA 72-4 poate fi folosit pentru monitorizarea carcinomului gastric postoperator pentru că indică devreme recidiva bolii. Nivelul său poate fi crescut și în afecțiuni non-maligne cum ar fi pancreatita. Diabetul zaharat nu influențează nivelul CA 72-4.

**Tabelul 23.VI Sensibilitatea CA 19-9
în diverse afecțiuni tumorale**

Tumorele	Sensibilitatea (%)
Pancreas	70-95
Căi biliare	55-75
Colon	60
Ficat	50
Stomac	60
Plămâni	15
Glanda mamară	14

**Tabelul 23.VII Specificitatea
CA 19-9**

Boala	Valori crescute (%)
Ciroză hepatică	12
Colecistită	25
Pancreatită	18
Apendicită	11
Hernie	3

Tabelul 23.VIII Sensibilitatea CA72-4

Tumori	Sensibilitate (%)
Gastric	78
Ovarian (mucinos)	82
Pulmonar (altele decât cele cu celule mici)	72

Tabelul 23.IX Specificitatea CA72-4

Boli benigne	Valori crescute (%)
Stomac	4
Ovar	4
După menopauză	3

Tabelul 23.X Sensibilitatea și specificitatea comparativă a CA72-4, CA19-9, CEA în afecțiuni gastrice

	CA72-4 > 8 ng/ml	CA19-9 > 37 U/ml	CEA > 5 ng/ml
Carcinom	78%	60%	51%
Boli benigne	1%	7%	9%

Tabelul 23.XI. Corelația între valorile crescute ale CA72-4, CA19-9, CEA și stadiul tumorii gastrice

Stadiul	CA72-4 > 8 ng/ml	CA19-9 > 37 U/ml	CEA > 5 ng/ml
I	14%	4%	1%
II	28,5%	12,5%	12,548%
III	64%	46%	32%
IV	85%	70%	65%

23.4.6 ANTIGENUL TUMORILOR MAMARE – CA 15-3

Este o glicoproteină de tip mucinos cu masa moleculară de 300-400 kDa, prezentă în celulele epiteliale secretorii și în secreții, codificată de gena MUC1. A fost identificat cu 2 anticorpi monoclonali diferiți: 115D8 și DF3. Anticorpul 115D8 a fost obținut prin imunizare cu lipide din laptele uman, iar anticorpul DF3 prin imunizare cu lipide din membrana celulelor de carcinom mamar.

Valori normale: 0-22 U/mL

Timpul de înjumătățire: 4-6 zile

Are o sensibilitate semnificativ mai mare în comparație cu CEA în detectarea carcinomului mamar aflat în diferite stadii (Tabelul 23.XII), dar specificitatea la valori sub 40 U/mL este discutabilă (Tabelul 23.XIII).

Tabelul 23.XII Sensibilitatea CA 15-3 și CEA în diverse stadii ale carcinomului mamar

Stadiul bolii	CA15-3 > 25U/ml (%)	CEA > 5 U/ml (%)
T1	25	9
T2	32	11
T3+T4	35	14
Media:	30	11
Metastaze		
Locale	46	12
Osoase	79	44
Hepatice	79	75
Media:	69	41

Peste 40 U/mL probabilitatea neoplaziei este de 80%. CA 15-3 este folosit pentru monitorizare postoperatorie pentru că indică recidiva cu câteva luni înainte ca diagnosticul clinic să fie posibil (Tabelul 23.XIV). „Lead time” este perioada de timp care trece de la prima creștere a concentrației markerului și până când detectarea clinică a recăderii devine posibilă.

Mai recent acest marker a fost folosit (coroborat cu alte variabile clinico-patologice) ca factor de prognostic al răspunsului la terapie și al intervalului de timp până la apariția recurențelor în boala canceroasă mamară avansată local. S-a observat că valori crescute de CA 15-3 se corelează cu un răspuns slab la chimioterapie. Mai mult, nivele persistent crescute de CA 15-3 după chimioterapie, conjugate cu invazia limfatică și expresia crescută a genei HER2 în țesutul tumoral se corelează cu o rată înaltă de apariție a recurențelor.

23.4.7 RECEPTORUL 2 AL FACTORULUI DE CREȘTERE EPIDERMIC (HUMAN EPIDERMAL GROWTH-FACTOR RECEPTOR 2)

Se mai numește ErbB-2, HER-2/neu sau CD340 și este o proteină care amplifică agresivitatea cancerului mamar. Face parte din familia receptorilor tirozin-kinazici pentru factorul de creștere epidermic. Se găsește pe suprafața celulară și este implicat în creșterea și diferențierea celulelor. Gena HER2/neu care codifică această proteină este o proto-oncogenă localizată pe brațul lung al cromozomului 17. Expresia acestei gene este reglată de receptorii pentru estrogeni. *Tamoxifenul* (antagonist al receptorilor pentru estrogeni) are un efect de down-regulation asupra genei HER2. În situația în care coactivatorul AIB-3 este preponderent față de corepresorul PAX2, tamoxifenul va avea un efect de up-regulation asupra HER-2, ceea ce induce rezistența celulelor tumorale la efectul antiestrogenic al tamoxifenului.

Tabelul 23.XIII Specificitatea CA 15-3

Concentrația CA15-3 (U/ml) în alte boli benigne și maligne: CA15-3 (%)						
	>22	>25	>30	>35	>40	media +/- ds
Persoane sănătoase	9,4	5,5	1,3	0,5	0,09	13,3+/-6
Hepatita acută	63	50	38	25	0	24,7+/-10
Hepatita cronică	57	43	29	29	14	25,4+/-13
Ciroză	39	39	31	27	23	26,8+/-19
Boli maligne						
Stomac	14	7	7	7	7	20,5+/-30
Ficat	36	28	21	14	14	44,2+/-124
Pancreas	80	80	70	70	50	51,2+/-53
Prostată	100	50	30	28	20	26,2+/-11
Plamâni	71	71	60	53	40	63,6+/-76
Ovare	66	64	55	39	34	59+/-64

Tabelul 23.XIV Valoarea CA 15-3 în monitorizarea postoperatorie

Cut-off (U/ml)	Valori crescute înainte de diagnostic (%)	Valori în momentul diagnosticului (%)	„Lead time” maxim (luni)
25	70	76	9
40	63	76	7

Aproximativ 15-30% din cancerele mamare prezintă o amplificare a genei HER-2 sau o supra-expresie a produsului său proteic, ceea ce se asociază cu o rată mai mare a recurențelor și cu un prognostic mai rezervat. Tumorile mamare HER-2 pozitive au tendința să crească și să metastazeze mai repede decât alte cancerle mamare. Toate cazurile nou-diagnosticate de cancer mamar ar trebui testate pentru HER-2. Cele HER-2 pozitive au o probabilitate mai mare de a răspunde la tratamentele care acționează împotriva receptorului HER-2 de pe suprafața celulelor canceroase mamare. Acest receptor este ținta anticorpului monoclonal umanizat *Trastuzumab* (herceptin). Acesta este folosit cu succes în terapia țintită a cancerelor mamare care prezintă o supra-expresie a genei HER2. Unul din mecanismele prin care acționează trastuzumabul după legarea de HER-2 este creșterea cantității de proteină p27 a cărei rol este de a stopa proliferarea celulară. Un alt anticorp monoclonal care acționează pe receptorul HER-2 este *Pertuzumab*. Standardul de aur pentru identificarea pacienților care ar beneficia de un tratament cu Trastuzumab este evidențierea genei HER-2/neu prin FISH (Fluorescent in situ hybridization). Expresia amplificată a acestei gene poate fi întâlnită și în alte afecțiuni maligne: tumori ovariene, tumori gastrice, tumori uterine (carcinom endometrial seros). Nivelul de HER-2/neu se va determina prin analiza unor probe tisulare prelevate din masa tumorală.

23.4.8 ANTIGENUL OVARIAN – CA 125 (CARBOHYDRATE ANTIGEN 125)

CA125 este o glicoproteină cu masa moleculară de 200 kDa. CA125 a fost identificat cu un anticorp monoclonal (OC 125). CA125 II de a doua generație a fost identificat cu un alt anticorp (M 11), care a crescut semnificativ specificitatea acestui marker (specificitate 95%). Această glicoproteină rezultă din glicozilarea masivă a unei mucine (mucina 16), care la oameni este codificată de gena MUC16 de pe cromozomul 23.

Structural, CA125 este alcătuit dintr-un capăt N-terminal (format din 12070 aminoacizi, bogat în resturi de serină/treonină), un domeniu central (conține peste 60 de unități repetitive de 156 aminoacizi fiecare) și un capăt C-terminal (conține 284 de aminoacizi și are o porțiune extracelulară, una transmembranară și o prelungire citoplasmatică). Epitopii recunoscuți de anticorpii anti CA125 folosiți în prezent (OC125 și M11) sunt localizați pe un inel cisteinic din regiunea repetitivă centrală.

CA-125 este prezent în epiteliul următoarelor țesuturi și organe: conjunctivă, cornee, urechea medie, trahee, bronșii, ovar, pancreas, vezica biliară, stomac, rinichi, colon. Se găsește în cantități crescute în lichidul amniotic, laptele și serul femeilor însărcinate.

Este cel mai bun marker tumoral existent în prezent pentru detectarea carcinoamelor ovariene seroase și nediferențiate. Sensibilitatea în stadiile I și II este în medie de 65%; în stadiile III și IV de 85%. În cazul tumorilor mucinoase, care reprezintă aproximativ 10% din carcinoamele ovariene, sensibilitatea este mai mică; de aceea în aceste cazuri este mai sigură combinarea CA125 cu CA72-4.

În vederea folosirii acestui marker ca test de *screening* pentru neoplasmul ovarian, se poate determina nivelul de CA125 combinat cu ultrasonografia trans-vaginală. Astfel se va

obține o sensibilitate și specificitate mai mare a testului. Mai recent s-a conceput un algoritm de determinare a riscului pentru cancer ovarian (ROCA – the Risk of Ovarian Cancer Algorithm) bazat pe următoarele observații:

- Pacienții cu tumori benigne au, în general, niveluri constante de CA125, chiar dacă acestea sunt crescute.
- În cazul pacienților cu cancer ovarian nivelurile de CA125 sunt progresiv crescânde. Astfel, dacă se fac determinări seriate ale nivelurilor de CA125 se va obține o sensibilitate crescută.

Valori normale: 0-35 U/mL

Interval de graniță: 35-65 U/mL

Timpul de înjumătățire în ser: 2-6 zile

Specificitatea corespunde cerințelor: cazurile fals pozitive apar în grupul de control sănătos cu o frecvență de 1%, iar în grupul de boli benigne cu o frecvență de 5-10%.

Sensibilitatea este mai scăzută (30-40%) în cazul tumorilor ginecologice non-ovariene (endometru, col uterin, vagin).

Cauza frecventă a rezultatelor fals pozitive este endometrita, diabetul zaharat, ciroza hepatică, insuficiența renală cronică.

Este indicat mai ales pentru monitorizarea evoluției bolii și a terapiei. Dacă nivelul CA125 rămâne în mod constant peste 100 U/mL și/sau dacă două testări succesive arată o creștere cu 50% a concentrației acestui marker, atunci probabilitatea ca boala să fie progresivă este de >90%.

Studii mai noi arată că CA125 este crescut și în sindroamele coronariene acute și în disfuncția sistolică sau insuficiența cardiacă acută. Nivelul de CA125 crește în concordanță cu nivelul BNP (*B-type natriuretic peptide* sau *brain natriuretic peptide*). Mai mult, pentru a diagnostica edemul pulmonar se poate determina nivelul de CA125 combinat cu BNP. În acest caz testul are o acuratețe de 83% față de 49% în cazul în care se determină doar BNP.

23.4.9 ANTIGENUL SPECIFIC PROSTATIC – PSA

Este o glicoproteină cu o greutate moleculară de 30-34 kDa fiind asemănătoare structural cu kalikreinele glandulare. Este sintetizată de celulele epiteliale prostatice și secretată în lichidul seminal. Are funcția unei serin-proteaze. Activitatea proteolitică a PSA în sânge este inhibată prin formarea unor complexe ireversibile cu inhibitori de protează (alfa-1-antichimotripsina, alfa-2-macroglobulina și alte proteine de fază acută).

PSA se găsește în sânge în două forme : legat de proteine transportoare sau liber.

Aproximativ 30% din PSA circulant există în formă liberă, dar este inactiv. În ceea ce privește controlul secreției de PSA, un rol decisiv îl au hormonii androgeni. Efectele celulare ale androgenilor sunt mediate de receptorii acestora. În 1978 Shain and Boesel au arătat că receptorii citoplasmatici ai androgenilor la celulele prostatice hiperplazice canine erau de 4-6 ori mai numeroși decât în celulele prostatice normale.

Datorită faptului că PSA este prezent și în glandele para-uretrale, anale și țesutul mamar (și tumorile maligne derivate din acestea) nivele scăzute pot fi detectate și în serul femeilor.

În principal, nivelul PSA este folosit pentru monitorizarea evoluției bolii, a eficienței terapeutice și pentru detectarea recăderilor la pacienți cu *carcinom de prostată*.

Scăderea concentrației PSA până la nivele nedetectabile este un indicator al succesului terapeutic.

Valori normale: 0-2,5 ng/mL, iar cut-off: 4 ng/mL.

Timp de înjumătățire: 1-2 zile.

Valori crescute apar în boli benigne (prostatită, hipertrofie de prostată) și în carcinom de prostată.

Inflamația sau traumatismul prostatei (în cazul retenției urinare, prin tușeu rectal, cistoscopie, colonoscopie, biopsie transuretrală, tratament laser sau ergometrie) pot determina creșterea nivelului de PSA. PSA mai poate fi crescut la pacienții vârstnici și 1-2 zile după ejaculare.

Este un marker tumoral clasic cu o sensibilitate înaltă, dar specificitate redusă, propus pentru screening-ul cancerului de prostată, în special la grupa de vârstă peste 50 de ani. Se estimează că tumora prostatică este răspunzătoare astăzi de doar 9% din decesele cauzate de cancer datorită diagnosticării timpurii și a tratamentului eficace. Cu cât este mai extinsă folosirea PSA cu atât este mai mare rata diagnosticării cancerului prostatic într-un stadiu incipient și mai mică rata deceselor.

Cut-off-ul nivelului seric al PSA este 4 ng/mL (Tabelul 23.XV).

Majoritatea medicilor consideră că nivele ale PSA sub 4 ng/mL se corelează cu o probabilitate scăzută a existenței unui cancer de prostată.

Valori peste 10 ng/mL de obicei indică prezența unei afecțiuni maligne prostatice cu o specificitate a testului de peste 50%.

Intervalul de valori cuprins între 4 și 10 ng/mL poartă numele de zonă gri (gray zone). Doar 25% până la 35% din pacienții cu nivele ale PSA în această zonă de graniță au cancer prostatic confirmat histologic.

Un test util atunci când nivelele PSA sunt situate în zona de graniță (4-10 ng/mL) este măsurarea PSA liber (*free PSA*) sau procentul de PSA liber (%fPSA). Cu cât procentul de fPSA (*free PSA*) este mai mare cu atât probabilitatea unei afecțiuni maligne este mai mică. Dacă procentul de fPSA reprezintă mai mult de 25% din valoarea PSA total, probabilitatea existenței unui cancer prostatic este redusă. Un procent de fPSA sub 10% arată o probabilitate mare a afecțiunii maligne și impune efectuarea unei biopsii (Tabelul 23.XVI).

Screening-ul cancerului prostatic folosind PSA are specificitate scăzută, având ca rezultat un număr de biopsii care nu sunt necesare. Unii clinicieni consideră utilă monitorizarea în timp a evoluției nivelului seric al PSA. Aceasta poartă numele de viteză PSA (viteza cu care crește nivelul seric în timp). Pentru a determina acest parametru se va măsura concentrația PSA de cel puțin 3 ori într-o perioadă de 18 luni. Viteza PSA poate fi folosită pentru identificarea precoce a stărilor cu risc vital înainte ca tratamentul local (chirurgical, radioterapie) să fie depășit. Viteza PSA este considerată un indicator al evoluției bolii către o afecțiune amenințătoare de viață. Bărbații cu o viteză a PSA peste 2 ng/mL/an

Tabelul 23.XV Valorile normale ale PSA seric total în funcție de vârstă

Vârsta (ani)	Concentrații serice (ng/mL)
<40	<1.4
40-49	<2.0
50-59	<3.1
60-69	<4.1
>70	<4.4

Tabelul 19.XVI Probabilitatea de existență a unui cancer pe baza valorilor PSA și a fracțiunii fPSA

PSA (ng/mL)	Probabilitatea unui cancer (%)	fPSA (%)	Probabilitatea unui cancer (%)
0-2	1	0-10	56
2-4	15	10-15	28
4-10	25	15-20	20
>10	>50	20-25	16
		>25	8

au risc semnificativ mai mare de mortalitate din cauza unei afecțiuni maligne prostatice comparativ cu pacienții care au oricare din ceilalți factori de risc înalt.

Deși radioterapia sau prostatectomia sunt metode eficiente de tratament, nivelul PSA poate crește în medie cu 30-40% în primii 10 ani. Aceste creșteri sugerează persistența unui număr de celule maligne, în ciuda efectuării acestor tratamente. Din acest motiv biopsia prostatică este recomandată după radioterapie pentru a identifica boala locală persistentă, în vederea administrării unui tratament de salvare înaintea dezvoltării metastazelor.

Pacienții pot fi incluși în clase de risc (înalt sau scăzut) pentru dezvoltarea cancerului de prostată și prin screening-ul unui set de gene pe baza statusului metilării acestora. Pentru a demonstra această metodă, au fost colectate probe de urină după masaj prostatic de la *pacienți cu cancer prostatic localizat* la care urmează să se efectueze prostatectomia radicală și de la *persoane sănătoase*. Urina a fost folosită pentru a extrage ADN care ulterior a fost supus unor examinări cantitative folosind PCR în timp real specifică pentru metilarea aberantă a unor gene (*Methylation Specific PCR*). Patru gene (GSTP1, RASSF1a, APC și RARB2) au prezentat o metilare aberantă semnificativă statistic în lotul pacienților cu cancer față de lotul martor. Sensibilitatea și acuratețea testului care folosește setul de gene menționat este de 86% și respectiv 89%, constituind o metodă fezabilă de clasificare a pacienților în grupe de risc (scăzut/înalt) pentru prezența cancerului. Acest test necesită însă validarea în cadrul unor studii mari de cohortă în ceea ce privește specificitatea, reproductibilitatea și cost-eficiența.

23.4.10 CYFRA 21-1

Este o subunitate acidă a citokeratinei 19. Citokeratinele sunt proteine de susținere care, împreună cu filamentele de actină și microtubulii, formează citoscheletul celular. Această citokeratină face parte dintr-un grup de proteine filamentare intermediare responsabile de integritatea structurală a celulelor epiteliale. Deși este exprimată în toate țesuturile organismului, se întâlnește cu precădere în plămâni. Se folosește pentru a identifica neoplaziile pulmonare (*carcinom pulmonar non -parvicelular*), dar și alte tumori cu celule scuamoase. Mai poate fi folosit și pentru a diferenția tumorile pulmonare maligne de afecțiunile benigne

ale plămânului în asociere cu alte date clinice și radiologice. Spre deosebire de ceilalți markeri tumorali ai căror epitopi sunt glicoproteine exprimate pe suprafața celulară, în cazul CYFRA 21-1 epitopul este o polipeptidă care cel mai probabil este eliberată în circulația sanguină după moartea celulei.

Valori normale: < 3,3 ng/mL

Valori crescute: carcinom pulmonar non-parvicelular – specificitate 95%.

Se pot întâlni valori crescute și în unele afecțiuni non-maligne, cum ar fi fibroza pulmonară, ciroza hepatică, insuficiența renală, boli urologice benigne, instilații intravezicale sau în infecții pulmonare.

Se pare că CYFRA 21-1 poate oferi informații superioare CEA sau CA 15-3, atât în ceea ce privește eficiența terapiei cât și în diagnosticul recurențelor din cancerul mamar.

23.4.11 ANTIGENUL CELULELOR CARCINOMATOASE SCUAMOASE (SCC)

SCC reprezintă o fracțiune a TA-4 (antigen asociat tumorilor) și aparține familiei inhibitorilor de serin-proteaze.

Cercetarea regiunii genomice a SCC a evidențiat prezența a două gene, SCC1 și SCC2 ambele localizate pe cromozomul 18. SCC1 codifică izoforma neutră iar SCC2 izoforma acidă a SCC.

Izoforma neutră este prezentă atât în celulele epiteliale normale cât și în tesuturile maligne în timp ce izoforma acidă se găsește doar în celulele tumorale.

Izoforma acidă poate fi întâlnită în serul pacienților cu carcinom bine diferențiat cu celule scuamoase.

Peste 90% din cancerele capului și gâtului sunt carcinoame cu celule scuamoase. De asemenea 80-90% din tumorile invazive de col uterin și 25-30% din neoplasmelor pulmonare sunt carcinoame scuamoase.

Valori normale: < 2-2,5 ng/mL

Valori crescute: se întâlnesc în carcinoamele cu celule scuamoase ale colului uterin, vulvei, vaginului, capului și gâtului, plămânului și esofagului precum și într-o serie de afecțiuni non-maligne ale pielii (eczeme, epidermită eritrodermică, pemfigus sau psoriazis), plămânilor (TBC, pneumonie, ARDS, sarcoidoză, pleurezie) în ciroză, hepatită, insuficiență renală sau boală inflamatorie pelvină. În consecință, nivelurile serice ale SCC trebuie interpretate doar coroborat cu ale altor markeri tumorali și cu datele clinice și imagistice.

23.4.12 ANTIGENUL POLIPEPTIDIC TISULAR (TPA)

Este un antigen asociat tumorilor universal, deoarece prezintă valori crescute indiferent de locul tumorii (Tabelul 23.XVII). TPA este un polipeptid cu masa moleculară de 180 kDa, fiind de fapt un amestec de citocheratine:

- Citocheratina 19 - 44%;
- Citocheratina 18 - 36%;
- Citocheratina 8 - 30%.

Este prezent în țesuturile fetale, placenta, epiteliul organelor cavitare.

Tabelul 23.XVII Sensibilitatea TPA în diverse tumori maligne

Localizarea tumorii	Sensibilitate (%)
Plămâni - cu celule mici	90-95
Plămâni - altele decât cele cu celule mici	90-95
Mamar – preoperator	40-95
– postoperator	75-85
Ficat	80-90
Pancreas	80-90
Colon, rect – preoperator	10-85
– postoperator	70-80
Vezica urinară	80-90
Prostată	80-90
Ovar	80-90
Tiroidă	40-60
Cap, gât	60-80

Sintetizat în membrana celulelor canceroase umane, este secretat activ în lichidele biologice.

Valori normale în ser: 0-90U/L

Valori normale în urină: <500U/L

Timp de înjumătățire: 1 zi

Specificitatea este medie/ slabă. TPA crește frecvent în inflamații, infecții respiratorii, diabet, hepatită, pancreatită, ciroză hepatică. Este folosit și singur în acele cazuri în care nu există alți markeri specifici (ex. tumorile vezicii urinare). Combinat cu alți markeri tumorali, poate crește semnificativ eficacitatea diagnostică (Tabelul 23.XVIII). În contrast cu ceilalți markeri, a căror concentrație se corelează cu masa tumorală, TPA indică activitatea actuală a tumorii, de aceea mai este numit și "antigen de proliferare". TPA este sintetizat în faza S a ciclului celular și concentrația TPA se corelează cu proliferarea tisulară. O valoare de peste 120 U/L indică clar un proces proliferativ, care poate fi de natură benignă sau malignă.

Tabelul 23.XVIII Sensibilitatea TPA în comparație cu alți markeri în câteva tipuri de tumori mai frecvente

	Plamân	Colon, rect	Vezica	Sân
TPA	++++	++++	++++	++++
TPS	+++	++	++	++
CYFRA	++++	+	+	+
CEA	++	+++	++	+
NSE	+++	+	+	+
CA15-3	+	+	+	++
CA19-9	+	++	+	+

Sensibilitate (%): + = 0-20 , ++ = 21-40 , +++ = 41-60 , ++++ = 61-80

TPA arată mai rapid și mai precis schimbările survenite în procesul malign, fie că este vorba despre monitorizare sau despre terapie. Poate fi identificat în urină, salivă, lichidul de lavaj bronhoalveolar, ascită. Determinările din aceste lichide sunt de multe ori mai valoroase decât determinările din ser. Fragmentele de citocheratină au o sensibilitate diferită în funcție de locul tumorii.

23.4.13 ANTIGENUL TUMORAL AL VEZICII URINARE (BLADDER TUMOR ANTIGEN - BTA)

Se găsește în urina pacienților cu cancer vezical, dar poate fi detectat și în unele afecțiuni non-maligne cum ar fi litiaza renală sau infecțiile de tract urinar. Testul este unul calitativ, rezultatul fiind pozitiv (BTA prezent) sau negativ (BTA absent). Se poate folosi, coroborat cu NMP22 pentru a diagnostica recurența unui cancer vezical. Totuși valoarea diagnostică și prognostică a BTA în cazul cancerului vezicii urinare, este inferioară cistoscopiei.

23.4.14 PROTEINA 22 A MATRIXULUI NUCLEAR (NUCLEAR MATRIX PROTEIN 22 - NMP22)

Este o proteină localizată în nucleul celulelor. Nivelele de NMP22 sunt frecvent crescute (peste 10 U/mL) în urina pacienților cu cancer al vezicii urinare.

Nu se recomandă dozarea NMP22 pentru detecția primară a cancerului de vezică urinară sau pentru monitorizarea de rutină a pacienților care au fost supuși tratamentului. Poate fi utilizat alături de cistoscopie pentru a identifica pacienții cu boală reziduală sau care prezintă recurențe la scurt timp după operație. Nivele crescute se pot decela și în unele afecțiuni non-maligne sau imediat după chimioterapie recentă.

Valori normale: 0,0-10,0 U/mL

23.4.15 INHIBITORUL TISULAR AL METALOPROTEINAZELOR TIPUL 1 (TIMP-1 - TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASES TYPE 1)

TIMP-1 este o glicoproteină cu masa moleculară de 25 kDa. Este implicată în inhibarea matrix metaloproteinazelor, promovarea proliferării celulare și inhibarea apoptozei.

S-a demonstrat că concentrațiile plasmatice ale acestui inhibitor sunt semnificativ mai crescute la pacienții cu carcinom colorectal comparativ cu subiecții sănătoși, cei cu boală inflamatorie intestinală, subiecții cu adenoame sau cei cu cancer de sân.

23.5 SISTEMUL ENDOCRIN DIFUZ

Unele sindroame rare sunt asociate cu neoplazia unor celule endocrine, sau care secretă substanțe cu proprietăți de neurotransmițători dar, datorită faptului că sunt distribuite difuz în țesuturi de origine non-ectodermică, sunt considerate în mod obișnuit ca fiind organe non-endocrine. Multe dintre aceste celule au caracteristici citologice comune cu celulele de origine embrionară ectoblastică. Tehnicile de colorare au arătat proprietatea lor de a prelua precursori aminici și de a-i decarboxila, cu producerea de amine. De aici denumirea de APUD

(Amine Precursor Uptake and Decarboxilation). Tumorile acestor celule au fost denumite "APUD-oame". Multe se dezvoltă în tractul gastro-intestinal și în pancreas.

23.5.1 CATECOLAMINELE

Țesutul nervos simpatic, alcătuit din componenta medulară a suprarenalei și din ganglionii simpatici, derivă din creasta neurală embrionară. Adrenalina este aproape exclusiv producția medulosuprarenalei în timp ce noradrenalina este produsă de terminațiile nervoase simpatice. Adrenalina și noradrenalina sunt formate din același precursor (tirozina) via dihidroxifenilalanina, DOPA și dihidroxi-fenilamina (dopamina). DOPA, dopamina, adrenalina și noradrenalina sunt toate catecolamine.

Adrenalina și noradrenalina sunt metabolizate ambele spre o formă inactivă, 4-hidroxi 3-metoxi mandelat, adesea denumit și acid vanilmandelic (AVM). Adrenalina, noradrenalina și conjugatii, respectiv metabolizii acestora, acidul vanilmandelic, pot fi determinate în urină.

Atât adrenalina, cât și noradrenalina acționează asupra sistemului cardiovascular. Noradrenalina cauzează vasoconstricție generalizată cu hipertensiune și paloare, în timp ce adrenalina dilată vasele sanguine musculare, cu efecte variabile asupra presiunii sanguine. Adrenalina poate cauza hiperglicemie datorită stimulării glicogenolizei și a altor efecte antiinsulinice.

23.5.1.1 Tumorile secretante de catecolamine

Tumorile sistemului nervos simpatic, fie că aparțin glandei suprarenale, fie că apar în zonele extra-adrenale, produc catecolamine în exces, fiind diferențiate două tipuri mari, complet diferite, după manifestările clinice ale acestora:

- Feocromocitoamele survin în țesuturile cromafine, 90% aparținând medularei suprarenale și aproximativ 10% țesuturilor extrasuprarenale. Survin mai ales la adulții tineri și de obicei sunt non-maligne. Semnele și simptomele acestora sunt în strânsă relație cu concentrațiile crescute în plasmă ale catecolaminelor. Cele mai caracteristice simptome sunt hipertensiunea paroxistică însoțită de anxietate, transpirații, dureri de cap, paloare, eritem facial. Hipertensiunea poate fi ocazional persistentă. De asemenea, sunt însoțite de hiperglicemii care pot fi suficient de marcante pentru a produce glicozurie, fenomene care apar concomitent cu puseul paroxistic hipertensiv. Feocromocitoamele sunt cauze rare de hipertensiune, dar sunt curabile prin extirparea chirurgicală a tumorii. Mai ales la persoanele tinere cu hipertensiune arterială, prezența feocromo-citomului este prima cauză care ar trebui exclusă.
- Neuroblastoamele sunt tumori ale țesuturilor nervoase, 40% aparținând medularei suprarenale și restul țesuturilor extrasuprarenale. Neuroblastoamele sunt tumori extrem de maligne ale țesutului nervos simpatic, survenind mai ales la copii. Concentrația plasmatică a catecolaminelor este adeseori mai crescută decât la pacienții cu feocromocitoame (secretă dopamină), dar simptomatologia clinică descrisă este rară la neuroblastoame.

23.5.1.2 Diagnosticul tumorilor secretante de catecolamine

Tumorile secretante de catecolamine se dezvoltă împreună cu alte anomalii, cum ar fi neurofibromatoza, boala von Recklinghausen sau carcinomul medular tiroidian și de asemenea cu hiperplaziile paratiroidiene, așa-numitele neoplazii endocrine multiple de tip II. Diagnosticul chimic al acestor tumori se face, de obicei, prin determinarea în urină a catecolaminelor sau a acidului vanilmandelic (AVM), principalul catabolit al catecolaminelor. O eliminare mai mare decât dublul limitei superioare a normalului poate fi edificatoare pentru acest gen de tumori, dar creșterea ușoară a eliminărilor produsului de catabolism al catecolaminelor poate fi întâlnită în unele forme de hipertensiune arterială esențială. O mulțime de componenți alimentari sau medicamentoși pot afecta determinarea AVM (consumul de banane, ciocolată, cacao, ceai, cafea, vanilie, sucuri de fructe, gemuri și jeleuri, guma de mestecat, alte produse alimentare cu coloranți sau edulcoranți). Se recomandă analiza urinei imediat după atacurile paroxistice de hipertensiune și repetarea testului la nevoie. Tehnicile imagistice, cum ar fi tomografia computerizată sau rezonanța magnetică nucleară sunt extrem de utile pentru localizarea proliferării maligne.

23.5.2 SINDROAMELE CARCINOIDE

23.5.2.1 Metabolismul normal al serotoninei (5-hidroxi triptaminei)

O categorie aparte de celule, denumite argentafine (datorită faptului că se colorează cu săruri de argint), există în mod normal în țesuturi care derivă din tractul intestinal embrionar. Acestea se găsesc din abundență în peretele ileonului și apendicelui, dar sunt distribuite și în pancreas, în peretele colonului și la nivelul rectului. Ele sintetizează amine active biologic, cum ar fi serotonina (5-hidroxitriptamina) din precursori aminici - în cazul serotoninei acesta fiind triptofanul. Triptofanul se transformă printr-un intermediar hidroxilat, 5-hidroxitriptofan, urmat de o dezaminare oxidativă catalizată de monoaminoxidaza (MAO), în acid 5-hidroxiindolacetic (5-HIAA). Acesta este forma principală de eliminare urinară a produșilor de secreție ai celulelor argentafine.

23.5.2.2 Cauzele sindromului carcinoid

Carcinoidul (inclus în grupa APUD-oamelor) se dezvoltă din celulele enterocromafine în tractul gastrointestinal (cel mai frecvent în ileon), pancreas, căi biliare. Tumorile argentafine sunt foarte rar localizate în alte regiuni, iar atunci este vorba despre un sistem de celule cu caracteristici histochimice și răspândire heterogenă și se presupune că fiecare substanță este sintetizată de un anumit tip de celulă. Celulele sistemului ADUD au rolul de a sintetiza amine și peptide biogene. Astfel și tumorile acestor celule vor sintetiza amine biogene. În carcinoid pot fi detectate aminele biogene dopamina și noradrenalina. Însă produsul cel mai caracteristic al acestor tumori este serotonina (5-hidroxitriptamina). Sindromul carcinoid este de obicei asociat cu concentrații crescute în plasmă ale serotoninei.

Tumorile localizate la nivelul ileonului sau apendicelui produc tardiv sindromul clinic tipic, în momentul în care deja au metastazat, mai ales la nivelul ficatului. Produșii de secreție ai

tumorilor intestinale sunt, de obicei inactivați la nivel hepatic, în timp ce produșii de secreție ai tumorilor dezvoltate în alte locuri, cum ar fi cele bronșice, sunt eliberate direct în circulația sistemică în forma activă, simptomatologia apărând mai repede. Este nevoie de triptofan 5-hidroxilaza, care transformă triptofanul în 5-hidroxitriptofan. Derepresia genei responsabile de sinteza acestei enzime în sindroamele maligne, conduce la sinteza exagerată de 5-hidroxitriptofan. Decarboxilaza și mono-aminoxidazele sunt prezente în cantitate normală în țesuturile non-argentafine, astfel încât 5-hidroxitriptofanul se va acumula. Comparativ cu tumorile carcinoide adevărate, în sindroamele carcinoide asociate cu carcinoame bronșice, expresia urinară de 5-hidroxitriptofan și 5-hidroxitriptamină este proporțional mai scăzută decât a produsului de metabolism, acidul 5-hidroxiindolacetic.

23.5.2.3 Caracteristicile clinice ale sindromului carcinoid

Semnele și simptomele cele mai frecvente sunt diareea, care poate fi suficient de severă pentru a cauza un sindrom de malabsorbție, dureri colicative, greață și vomă, eritem facial, crize de bronhospasm, afecțiuni valvulare cardiace (stenoze pulmonare), respectiv leziuni fibrotice ale inimii drepte. Acestea nu apar atunci când tumora primară este la nivel bronșic. Alături de serotonină, celulele argentafine excretă de asemenea, un peptid numit *substanța P*, care în exces, poate cauza tahicardie, creșterea motilității intestinale și hipotensiune. Simptomatologia din sindroamele carcinoide este mai probabil datorată prezenței substanței P, decât serotoninei. S-a sugerat că histamina ar fi la baza eritemului cutanat.

23.5.2.4 Diagnosticul sindromului carcinoid

Se bazează pe dozarea în urină a acidului 5-hidroxiindolacetic. Excreția zilnică a mai mult de 25 mg (125 μ mol) este element patognomonic, cu condiția ca pacientul respectiv să nu fi consumat banane, alune, produse care sunt foarte bogate în 5-hidroxiindol. Se restricționează aportul acestor substanțe cu 24 ore înaintea recoltării urinei. De asemenea, administrarea paracetamolului poate cauza creșteri false ale acestei substanțe în urină, datorită interferenței cu determinarea chimică a acidului 5-hidroxiindolacetic.

23.5.3 NEOPLAZIILE ENDOCRINE MULTIPLE (MEN) – SINDROAMELE PLURIGLANDULARE

Sunt sindroame rare în care două sau mai multe glande produc cantități însemnate de hormoni. Există două grupe principale de sindroame:

- MEN I – include transformări maligne ale două sau mai multe dintre următoarele glande:
 - Glanda paratiroidă (adenoame);
 - Celule insulare pancreatice (gastrinoame, insulinoame);
 - Hipofiza anterioară;
 - Cortexul adrenal.
- MEN IIa – include:
 - Carcinomul medularei tiroidiene;

- Feocromocitomul (tumori ale medulei suprarenale);
- Adenom sau carcinom paratiroidian;
- MEN IIb– include:
 - Carcinomul medulei tiroidiene;
 - Tumori ale medulei suprarenale;
 - Adenom sau carcinom paratiroidian (rar);
 - Variate anomalii somatice:
 - Sindrom marfanoid;
 - Neuromatoză mucoasă;
 - Pigmentare.

Ambele grupe de sindroame sunt de obicei familiale, transmise într-o manieră mendeliană dominantă.

23.6 TUMORI NON-ENDOCRINE PRODUCĂTOARE DE HORMONI

Neoplaziile pot cauza anomalii în sinteza și secreția hormonilor, de aceea hormonii și subunitățile lor pot fi folosiți ca markeri tumorali. Sinteza anormală de hormoni poate fi clasificată după următoarele criterii: locul sintezei, cantitativ și calitativ. După locul sintezei hormonii pot fi eutopici (sintetizați în țesut endocrin) sau ectopici (sintetizați în țesut non-endocrin). Astfel markerii neoplaziilor epitelului endocrin sunt: PTH, calcitonina, gastrina, catecolaminele, glucagonul, insulina, gonadotropina corionică, ACTH, STH și prolactina. Pe de altă parte, gonadotropina, ACTH și calcitonina sunt sintetizați și de țesutul neoplazic al unor organe care în mod normal nu sintetizează hormoni (plămâni, pancreas, glanda mamară, stomac, sistem nervos). Din punct de vedere cantitativ, în neoplazii sinteza de hormoni poate să crească sau dimpotrivă, să scadă. De multe ori sinteza crescută de hormoni este însoțită de un „sindrom endocrin” caracteristic (ex.: sindrom Cushing, insulinom, glucagonom, gastrinom, feocromocitom etc.). Hormonii sintetizați pot avea o structură normală, dar pot fi și precursorii unor hormoni sau hormoni cu o structură modificată, alterată. De obicei hormonii sintetizați în locurile ectopice au o structură heterogenă, câteodată complet diferită de structura hormonilor fiziologici.

Hormonii și precursorii acestora pot fi detectați în cantități mici (cu ajutorul tehnicilor imunochimice ultrasensibile) în multe organe și țesuturi care, în mod normal, nu sunt considerate a fi țesuturi endocrine. Când în acestea se dezvoltă tumori, cantități crescute de hormoni vor fi sintetizate și eliberate în circulație, producându-se sindroame care adesea sunt recunoscute ca fiind datorate producției ectopice de hormoni. Datorită faptului că producerea ectopică de hormoni sau substanțe similare hormonale nu este supusă controlului normal de feedback, aceasta este cel mai adesea excesivă. Multe tumori ale țesuturilor non-endocrine secretă substanțe hormonale foarte asemănătoare unor hormoni naturali, adesea identice cu acestea. Unele dintre aceste tumori s-au dovedit a secreta doi sau chiar mai mulți hormoni.

23.6.1 HORMONII EUTOPICI

În acest grup sunt incluse tumorile endocrine care secretă proprii hormoni într-o cantitate crescută. Aceste neoplazii pot fi identificate și monitorizate prin dozarea hormonului respectiv. Sensibilitatea poate fi crescută cu folosirea testelor de stimulare care cresc secreția hormonilor (Tabelul 23.XIX).

23.6.2 HORMONI ECTOPICI – MECANISMUL PRODUCERII ECTOPICE DE HORMONI

S-au propus mai multe teorii care să explice secreția ectopică hormonală. Hormonii ectopici sunt aproape întotdeauna peptide sau proteine. Teoretic cel puțin, fiecare celulă are capacitatea de a produce orice peptid sau proteină codificată în codul său genetic din acizii nucleici cromozomiali. Hormonii ectopici sau alte peptide pot fi produse de celulele maligne dacă acestea s-au întors la statusul pluripotent embrionar inițial. Aceasta poate cauza modificări histologice asociate cu neoplazia, uneori asociate cu sinteza semnificativă de peptide nedetectabile în mod normal în țesuturile diferențiate.

În ultimii ani s-a descoperit faptul ca sinteza de hormoni peptidici este o trăsătură comună a celulelor canceroase. Cele mai multe studii se referă la cancerul bronșic: 10% din pacienții cu această boală prezintă sinteză ectopică de hormoni.

Tumorile celulelor APUD (*amine precursor uptake and decarboxylation*) - "APUD-oamele" au o activitate intensă de sinteză hormonală. Aceste tumori sunt: cancerul pulmonar cu celule mici, carcinoidul, carcinomul celulelor Langerhans (insulinomul). Aceste tumori sintetizează în primul rând ACTH, care duce la apariția unui sindrom de hiperproducție ectopică a acestui hormon. Pe lângă ACTH, aceste tumori mai sintetizează și alți hormoni ectopici. Astfel, în cancerul pulmonar cu celule mici se sintetizează în paralel cu ACTH și lipotrofină (LPH) și mari cantități de calcitonină. Sinteza de gastrină și hCG este mai rară (Tabelul 23.XX).

În contrast cu APUD-oamele, carcinomul epidermoid și adenocarcinomul pulmonar nu sintetizează ACTH, LPH sau ADH decât foarte rar; sunt mai frecvent sintetizate în schimb calcitonina, hCG și STH.

Tabelul 23.XIX Tumori producătoare de hormoni eutopici și efectele acestora

Tumori	Hormoni	Efecte
Tumorile medulosuprarenalei Feocromocitom Neuroblastom	Adrenalina	Excreție urinară crescută de catecolamine și metaboliți
Tumorile corticosuprarenalei	Aldosteron Cortizol	Sindrom Conn diselectrolitemie
Tumorile hipofizare	Prolactina STH	Sindrom Cushing Excreție crescută de 17-CS
Pancreas - tumorile celulelor Langerhans (insulinom)	Insulina	Glicemie oscilantă
Pancreas – gastrinom	Gastrina	
Paratiroide – adenoame	PTH	Calciu seric fluctuant
Carcinom tiroidian medular	Calcitonina	
Coriocarcinom	hCG	

Tabelul 23.XX Tumori producătoare de hormoni ectopici

TUMORI	HORMONI
APUD-oame	
Cancer pulmonar cu celule mici Carcinoid	ACTH Lipotrofina (LPH)
Tumorile celulelor insulare (pancreas)	Vasopresina (ADH) Calcitonina, PTH, gastrina, (insulina, glucagon)
Non APUD-oame	
Plămâni- carcinom epidermoid și adenocarcinom	Calcitonina, PTH, STH, prolactina, insulina, glucagon
Cancer mamar	hCG, HPL, calcitonina, PTH, ACTH

Carcinomul mamar poate fi inclus în grupul non-APUD-oamelor pentru că sinteza hormonilor de tip APUD este foarte rară: sunt sintetizați mai ales hormoni și peptide placentare (hCG, HPL- Human Placental Lactogen).

Gonadotropina corionică umană (hCG)

Este un hormon produs în mod normal de către trofoblaștii placentari și atinge concentrații maxime în plasma femeii însărcinate în săptămâna a 8-a de sarcină. Este format din 244 de aminoacizi și are o masă moleculară de 36,7 kDa.

Molecula de hCG este compusă din două subunități – α și β . Subunitatea α este identică cu cea a hormonului luteinizant (LH), a hormonului foliculostimulant (FSH) și a hormonului tireotrop (TSH). Subunitatea β este specifică hCG.

Din acest motiv este preferată dozarea acesteia atunci când se analizează acest hormon. Prezența hCG în plasmă în afara sarcinii indică prezența țesutului trofoblastic anormal sau o tumoră secretantă de hormoni ectopici. β hCG este un marker tumoral cvasi-ideal pentru coriocarcinom (o proliferare malignă a vilozităților corionice ce se poate dezvolta din mola hidatiformă), dar poate fi folosit și pentru alte tumori cu celule germinale ale testiculului și ovarului. Mola hidatiformă se tratează prin chiuretaj uterin, însă dacă îndepărtarea este incompletă paciențele prezintă risc de dezvoltare a unui coriocarcinom. β hCG este un marker tumoral extrem de sensibil detectând tumori cu greutate de doar 1 mg (aproximativ 105 celule). Toate paciențele care au fost diagnosticate cu molă hidatiformă trebuie urmărite prin determinări periodice ale concentrațiilor plasmatice de β hCG. Acest marker poate fi folosit și ca un indicator al răspunsului terapeutic.

hCG este secretat și de aproximativ 50% din teratoamele testiculare și trebuie determinat împreună cu α -fetoproteina atunci când se face urmărirea pacienților după terapia antitumorală. Deoarece concentrația plasmatică a LH crește după orhiectomie este important să folosim o metodă care determină lanțul β al hCG pentru a evita reacțiile încrucișate care ar putea indica o creștere aparentă a hCG.

Valori normale:

- la bărbați și la femei < 5 U/L
- la femei în menopauză < 10 U/L.

Valori crescute: tumorile maligne ale celulelor germinale, seminoame, coriocarcinom, molă hidatiformă, în sarcina multiplă și rareori în adenocarcinomul gastric și pancreatic.

La interpretarea rezultatelor hCG trebuie să se ia în considerare posibilitatea existenței interferențelor date de prezența anticorpilor heterofilici sau creșterile tranzitorii datorate chimioterapiei.

Structura hormonilor ectopici diferă des de structura hormonilor fiziologici. Diferențele apar mai puțin în secvența primară a aminoacizilor, cât mai ales post-translațional, în forma precursorilor, subunităților. Astfel hormonii ectopici formează un grup heterogen în care predomină formele cu greutatea moleculară mai mare. Astfel de modificări caracterizează mai ales sinteza ectopică de ACTH.

Spre deosebire de hormonii secretați prin hiperactivarea patologică a glandelor endocrine, hormonii produși în situsurile ectopice nu se găsesc sub controlul de feedback negativ normal și sunt secretați în mod continuu. Producerea ectopică de substanțe asemănătoare hormonilor este evidentă clinic dacă acestea au și efecte hormonale.

23.6.3 SINDROAMELE HORMONALE

Unul dintre cele mai frecvente sindroame de acest fel este **hipercalcemia** datorată secreției excesive de PTH RP (parathormon-related-protein). Aceasta este asociată cu mai multe tipuri de afecțiuni maligne, incluzând carcinomul bronșic cu celule scuamoase. PTH RP conține cei 34 de aminoacizi aminoterminali ai hormonului paratiroidian, astfel încât are o acțiune similară acestuia asupra osului. Instalarea hipercalcemiei poate fi foarte rapidă în contrast cu aceea din hiperparatiroidismul primar.

Hiponatremia datorată secreției de hormon antidiuretic (ADH)

Producerea ectopică de ADH este cel mai adesea asociată cu o formă relativ rară de carcinom bronșic - cel cu celule în bob de ovăz. Scăderea graduală a osmolarității plasmatice permite restabilirea echilibrului osmotic de o parte și de alta a membranelor celulare, astfel încât pacienții pot să nu prezinte simptomele clinice ale hipoosmolarității. Nu este nevoie de tratament, cu excepția restricționării administrării de lichide; dacă osmolaritatea plasmatică scade suficient de rapid pentru a cauza o simptomatologie de tip edem cerebral, poate fi necesar un tratament mult mai intensiv. Perfuzarea de cantități mici de fluide hiperosmolare, concomitent cu administrarea unui diuretic va crește osmolaritatea plasmatică fără expansiunea volumului plasmatic.

Hipokaliemia consecutivă producerii excesive de hormon adrenocorticotrop (ACTH)

Secreția ectopică de ACTH stimulează secreția tuturor hormonilor adrenocorticali. Forma clinică este similară cu aceea a hiperaldosteronismului primar. Cel mai adesea, producerea ectopică de ACTH se realizează de către celulele carcinomului bronșic cu celule mici, dar a fost descris de asemenea frecvent în asociere cu alte leziuni maligne, în special cu tumorile carcinoide pulmonare. Pacienții prezintă hipokaliemie severă asociată cu alcaloză. Administrarea compensatorie de potasiu este eficientă doar dacă se administrează concomitent spironolactonă, amilorid sau triamteren.

Policitemia consecutivă unei secreții excesive de eritropoetină sau a unor molecule eritropoetin-like este bine cunoscută ca și complicație a carcinoamelor renale. Eritropoetina stimulează eritropoeza medulară. Datorită faptului că este vorba de o secreție inadecvată a unui hormon de origine renală, nu putem vorbi aici de o secreție ectopică de hormon. Oricum acest sindrom a fost raportat în asociație cu alte tumori, în special de natură hepatocelulară, de exemplu hepatomul primar.

Hipoglicemia datorată producerii excesive de insulină sau de insulin-like growth factor (IGF) este de asemenea rară, și a fost de asemenea raportată în asociere cu multe alte tumori, cum ar fi de exemplu carcinoamele hepatocelulare sau tumorile mezenchimale retroperitoneale sau toracice.

Ginecomastia datorată secreției de gonadotropină corionică umană (hCG) a fost asociată frecvent cu diverse tumori, cum ar fi carcinoamele bronșice, carcinoamele de sân sau ficat, datorită creșterii concentrației serice a acestui hormon. Sindromul este rareori întâlnit.

Hipertiroidismul datorat secreției excesive de hormon tireostimulant (TSH). Unele tumori cu celule trofoblastice cum ar fi coriocarcinoamele și teratoamele testiculare s-au dovedit a fi secretoare de substanțe TSH-like. Hipertiroidismul clinic este extrem de rar, chiar și atunci când concentrația plasmatică a hormonului este ridicată.

23.7 ENZIME ȘI IZOENZIME

Celulele canceroase au o activitate enzimatică diferită atât cantitativ, cât și calitativ. Folosirea enzimelor ca markeri tumorali este unul dintre primele evenimente din istoria biochimiei (Warburg – experimentele de glicoliză anaerobă pe celule canceroase). Cauzele creșterii în ser a activității enzimatică a unor enzime care provin din țesutul neoplazic sunt:

- necroza
- tulburări de permeabilitate
- alterări ale celulelor sau membranelor, cauzate de terapie.

În plus, enzimele pot fi eliberate și de țesuturile normale din organism, ca urmare a alterărilor provocate de procesul tumoral.

Enzimele folosite în general în biochimia clinică (amilaza, CK, γ -GT, etc.), nu sunt utile pentru diagnosticul primar al tumorilor, dar sunt utilizate pentru monitorizarea terapiei și evoluției bolii, ca markeri de linia a doua. Câteva enzime și izoenzime pot fi folosite însă și ca markeri tumorali de primă linie (fosfataza acidă). Aceste enzime au specificitate de localizare a tumorii (specificitate de organ).

23.7.1 FOSFATAZA ACIDĂ PROSTATICĂ -PAP

Este o enzimă secretată de prostată. În trecut era folosită pentru monitorizarea cancerelor prostatice deoarece la acești pacienți are concentrații serice mult mai mari. Ulterior a fost înlocuită de PSA.

Valoarea testului PAP, indiferent de nivel, nu trebuie interpretată ca fiind dovadă pentru prezența sau absența bolii maligne. Hiperplazia benignă de prostată, masajul prostatic și infarctul de prostată pot avea ca și consecință creșterea concentrației de PAP.

Studii recente sugerează că PAP ar avea un rol important în stabilirea prognosticului la pacienții cu cancer prostatic care au beneficiat doar de tratament local. Evaluarea corectă a acestor bolnavi este necesară deoarece astăzi se urmărește selectarea cât mai exactă a pacienților cu beneficii reale în urma unei terapii sistemice. În acest context, rolul PAP urmează să fie reconsiderat.

Valori normale: 0,0 – 3,5 ng/mL

Această enzimă se pare că are un rol și în transmiterea sexuală a virusului imunodeficienței umane (HIV). S-a observat că fragmentele PAP formează fibrile amiloidice. Aceste fibrile (denumite "amplificatori spermatici ai infecției virale" – *Semen-derived Enhancer of Virus Infection*) captează virionii HIV și promovează atașarea lor la celulele țintă, amplificând astfel potențialul infecțios al virusului HIV. Acest efect al PAP poate reprezenta o nouă țintă pentru prevenirea transmiterii infecției HIV pe cale sexuală.

23.7.2 ENOLAZA NEURON SPECIFICĂ- NSE

Este o enzimă citoplasmatică cu masa moleculară de 82-100 kDa și are rol în metabolizarea intracelulară a glucozei (catalizează transformarea 2-fosfogliceratului în fosfoenolpiruvat). Enolaza neuron-specifică este una din cele cinci izoenzime ale enolazei. Enolaza are trei tipuri de subunități: α (46 kDa), β (44 kDa) și γ (46 kDa) codificate de gene diferite. Aceste subunități se combină câte două și formează cinci izoenzime: $\gamma\gamma$, $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$ și $\alpha\gamma$. Izoenzimele homodimerice sunt mai frecvent întâlnite decât celelalte forme (Figura 23.4).

- Izoenzima $\alpha\alpha$ (enolaza non-neuronală - NNE, enolaza 1) se găsește în ficat, creier, rinichi, splină, tesutul adipos.
- Izoenzima $\beta\beta$ (enolaza mușchi-specifică - MSE, enolaza 3) se găsește în principal în cord și musculatura scheletică.

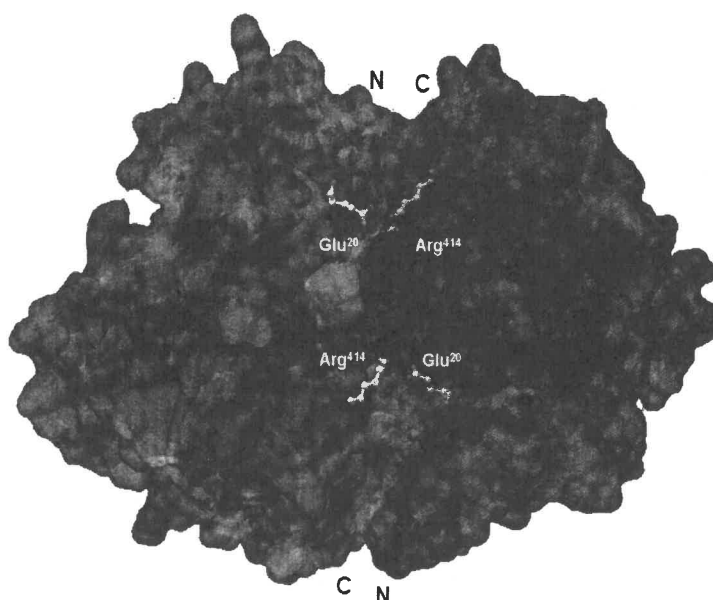


Figura 23.4 Enolaza neuron specifică – structură reprezentată cu ajutorul UCSF Chimera
(http://en.wikipedia.org/wiki/File:Enolase_with_differentiated_subunits.jpg).

- Izoenzima $\gamma\gamma$ (enolaza neuron-specifică – NSE, enolaza 2 - ENO2) se găsește în cantități crescute în neuroni și celule neuro-endocrine precum și în tumorile însoțite de diferențiere neuroendocrină (neuroblastom, carcinom pulmonar cu celule mici) (Tabelul 23.XXI). La pacienții cu acest tip de tumori se secretă în sânge o cantitate însemnată de NSE ca rezultat al distrugerii tisulare intense.

Cea mai importantă indicație a NSE este monitorizarea evoluției și terapiei pacienților cu tumori neuro-endocrine, în special cancerul pulmonar cu celule mici (Tabelul 23.XXII) și neuroblastomul. Indică foarte precis eficacitatea chimioterapiei – dacă după 48 ore de terapie nu se observă o creștere semnificativă în activitatea NSE, atunci tumora este rezistentă la tratament.

Valori normale: 0 – 13 ng/mL.

În 60-81% din cazurile de cancer pulmonar cu celule mici se întâlnesc concentrații crescute ale NSE. Valorile NSE se corelează cu gradul de extensie a bolii. Nivelurile persistent crescute de NSE sugerează lipsa răspunsului la chimioterapie. La 80-96% din pacienții aflați în remisie, NSE are valori normale.

La 62% din pacienții cu neuroblastom se întâlnesc niveluri crescute ale NSE care se corelează cu stadiul clinic al bolii.

NSE poate crește și în afecțiuni benigne cerebrale sau pulmonare.

23.7.3 TIMIDIN-KINAZA (TK)

Timidin-kinaza (dezoxitimidin kinaza) este o enzimă citosolică implicată în sinteza ADN. Sinteza ADN se poate face pe două căi:

- calea *de novo*
- calea de recuperare (în care nucleotidele sunt sintetizate din produșii de degradare ai ARN și ADN; este o cale de sinteză importantă deoarece unele țesuturi nu posedă capacitatea de a sintetiza ADN pe calea *de novo*)

Valori normale: 0-5 U/L.

Tabelul 23.XXI Sensibilitatea NSE în diagnosticul tumorilor însoțite de diferențiere neuro-endocrină

Tumori	Sensibilitate (%)
Neuroblastom	97
Carcinom pulmonar cu celule mici	83
APUD-oame	74

Tabelul 23.XXII. Sensibilitatea markerilor NSE – CEA în cancerul pulmonar

Tipul bolii	N	NSE	CEA
Carcinom cu celule mici	81	37,8 +/- 41,5 (74%)	12,2 +/- 16,2 (47%)
Alte carcinoame	108	9,4 +/- 3,5 (15%)	10,7 +/- 14,5 (46%)
Boli pulmonare benigne	79	7,2 +/- 2,0 (5,1%)	3,4 +/- 3,2 (13,9%)
Persoane sănătoase	92	7,1 +/- 2,0 (0%)	1,8 +/- 0,8 (0%)

În cadrul căii de recuperare, TK catalizează conversia dezoxitimidinei la dezoxitimidin-monofosfat, care apoi intră pe calea comună de sinteză a ADN (Figura 23.5).

Celulele umane conțin două izoenzyme ale TK: TK1 - citosolică (se asociază cu proliferarea celulară) și TK2 - mitocondrială (este necesară în sinteza mitocondrială a ADN).

Activitatea TK1 crește în faza G1/S a ciclului celular, ceea ce face posibilă folosirea acestei enzime ca și marker al proliferării celulare (la fel ca și TPA).

Activitatea enzimatică a TK oferă date prognostice și informații legate de eficiența terapeutică în unele afecțiuni maligne hematologice. În *limfomul non-Hodgkin* poate fi folosită atât pentru stadializare cât și pentru aprecierea răspunsului la tratament și a ratei de supraviețuire. Dacă tratamentul este eficient valorile serice ale TK se normalizează, iar o recădere a bolii sau transformarea acesteia într-o formă mai agresivă, are ca efect o creștere a concentrației serice față de nivelul inițial. În *limfomul Hodgkin* TK se corelează cu stadiul bolii.

În *leucemia limfocitară cronică* o concentrație serică peste 7 U/L se asociază cu o perioadă de aproximativ opt luni fără recăderi în timp ce pacienții cu valori sub 7 U/L pot avea o perioadă de până la 4 ani fără recăderi.

Nivelul seric al TK se corelează și cu stadiul clinic al *mielomului multiplu* oferind în același timp date prognostice referitoare la supraviețuire. Mai mult, TK poate fi folosită pentru diferențierea mielomului multiplu de gamapatiile monoclonale de cauză nedeterminată.

Determinarea nivelului de TK poate identifica precoce recurențele leucemiei mieloide și limfocitare acute, înainte ca acestea să poată fi observate microscopic. Există o legătură

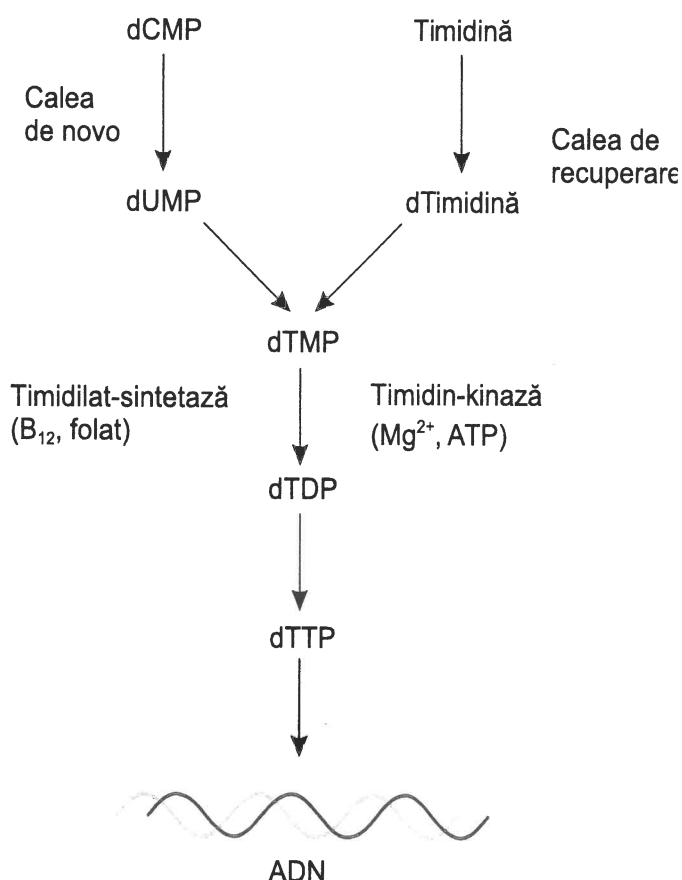


Figura 23.5 Calea de novo și calea de recuperare în sinteza ADN

În următoarele neoplazii feritina crește în 40-70% din cazuri:

- leucemia acută;
- limfom Hodgkin;
- carcinom pulmonar;
- carcinom de colon;
- carcinom hepatic;
- carcinom de prostată.

Se pare că feritina prezintă o mare afinitate pentru *high molecular weight kininogen* (HMWK) și formele clivate ale acestuia, care sunt inhibitori endogeni ai angiogenezei; cHMWK rezultă în urma clivării kininogenului cu greutate moleculară mare pe celulele endoteliale. După legarea feritinei la cHMWK se produce inhibarea efectului antiangiogenic pe care cHMWK îl are în mod normal rezultând un efect pro-angiogenetic. Prin antagonizarea efectului antiangiogenic al cHMWK feritina permite bradikininei și altor compuși proangiogenici să aibă un efect predominant. Nivelul crescut al feritinei în cazul inflamațiilor și al afecțiunilor maligne poate avea un rol în reglarea angiogenezei [9].

23.8.2 TIREOGLOBULINA

Este o glicoproteină dimerică de 660 kDa produsă de celulele foliculare ale tiroidei și folosită pentru sinteza de hormoni tiroidieni (tiroxina și triiodotironina). Funcția acestei glicoproteine este aceea de a transporta hormonul tiroidian în timpul sintezei și acumulării acestuia în tiroidă.

Tireoglobulina crește la majoritatea bolnavilor cu carcinom tiroidian, de aceea această proteină este folosită ca marker al cancerului tiroidian. Cea mai mare sensibilitate diagnostică o are în tumorile tiroidiene diferențiate (>90%). Nu există date suficiente despre sensibilitatea și specificitatea tireoglobulinei în tumorile nediferențiate. Nu există nici o corelație între valorile tireoglobulinei și carcinomul medular tiroidian. Concentrația tireoglobulinei crește și în alte boli tiroidiene: tiroidite, noduli tiroidieni benigni. Tireoglobulina este importantă mai ales în monitorizarea evoluției cancerului tiroidian: este folosită în asociere cu scintigrafia sau o poate chiar înlocui.

Valori normale: 3-60 ng/mL

Valori peste 500 ng/mL sunt observate în metastaze osoase sau pulmonare.

Împotriva tireoglobulinei se pot forma autoanticorpi. Aceștia pot modifica rezultatul analizelor și de aceea uneori se impune determinarea concomitentă și a autoanticorpilor.

Determinarea în sânge a ARNm folosit în sinteza tireoglobulinei este o metodă mai nouă, iar rezultatele nu sunt influențate de prezența autoanticorpilor.

23.8.3 BETA-2-MICROGLOBULINA (B2-MG)

Este o proteină cu o masă moleculară de 11,8 kDa. Este alcătuită din 100 de aminoacizi. Această proteină este identică cu lanțul ușor al antigenului de histocompatibilitate leucocitară HLA clasa I (Figura 23.6). Se găsește pe membranele tuturor celulelor diferențiate. Este

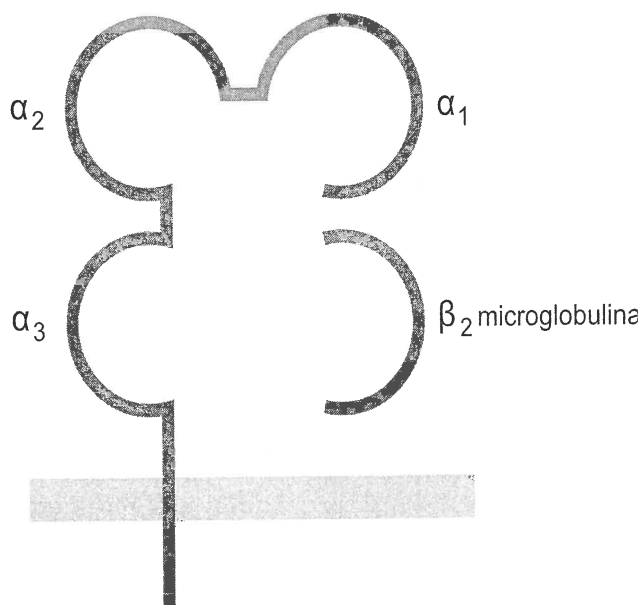


Figura 23.6 Reprezentarea schematică a complexului major de histocompatibilitate (HLA clasa I-a)

prezentă în lichidele biologice în concentrație scăzută (ser, urină, salivă, lichid cefalorahidian etc) sub două forme: liberă și legată de HLA. Este eliminată de rinichi în proporție de 98%.

Valori normale:

- ser: 1,2-2,5 mg/L
- urină: 0,02-0,3 mg/L (pH-ul acid < 6 o distruge);
- LCR: 0,8-1,8 mg/L

Timp de înjumătățire: 40 minute.

Cauzele creșterii beta-2-microglobulinemiei:

- sinteza crescută;
- distrugerea celulelor / turnover crescut în celulele sistemului imun;
- scăderea ratei filtrării glomerulare.

În cazul tumorilor, concentrația β_2 -mg crește datorită sintezei crescute în țesutul tumoral, dar poate crește și datorită inflamației sau alterărilor suferite de țesuturile din jurul tumorii (Tabel 23.XXIII).

Tabelul 23.XXIII Sensibilitatea β_2 - mg în diagnosticul diverselor tumori

Tumori	Sensibilitate
Pulmonar	42 %
Mamar	40 %
Colo-rectal	52 %
Gastric	57 %
Pancreatic	75 %
De col uterin	57 %
Limfom Hodgkin	48 %
Limfom nonHodgkin	62 %
LLC	69 %

Nivelurile sanguine ale $\beta 2$ -mg cresc în mielom multiplu, leucemie limfocitară cronică și unele limfoame. Poate fi folosit pentru aprecierea prognosticului pe termen lung în aceste afecțiuni (pacienții cu niveluri crescute au de obicei un prognostic mai rezervat) precum și pentru a evalua eficacitatea tratamentului (în mielomul multiplu).

Creșterea concentrației $\beta 2$ -mg nu este specifică tumorilor; apare și în inflamații, în boli renale, hepatice, infecții, SIDA etc.

Recent s-a arătat că supraexpresia genei care codifică $\beta 2$ -mg se corelează cu un stadiu tumoral avansat, invazia nodulilor limfatici și prognostic vital rezervat la pacienții cu carcinom scuamos al cavității orale. De asemenea se corelează și cu agresivitatea neoplasmului (migrarea celulară și invazia tumorală).

23.8.4 PROTEINA S-100

Este o proteină astroglială cu o masă moleculară de 21 kD, cu capacitatea de a lega calciul. Numele său derivă din faptul că această proteină este solubilă în proporție de 100% în sulfat de amoniu la pH neutru. Este alcătuită din 2 subunități (α , β) care se cuplează în forme homo- și heterodimere.

S-100 are o serie de funcții intra- și extracelulare cum ar fi: reglarea fosforilării proteinelor, a factorilor de transcripție și în homeostazia Ca^{2+} . De asemenea este implicată în dinamica constituenților citoscheletului, unele activități enzimatică, creștere și diferențiere celulară și în răspunsul inflamator.

Este prezentă în:

- celule gliale și celule Schwann ($\beta\beta$);
- celule gliale ($\alpha\beta$);
- mușchi striati, rinichi și miocard ($\alpha\alpha$);

Testul S-100 măsoară izoformele $\beta\beta$ și $\alpha\beta$ în ser și LCR.

Valori normale: $< 0,3 \mu\text{g/L}$

Proteina S-100 detectează cu o mare sensibilitate bolile sistemului nervos central. Constituie un parametru util de monitorizare a pacienților cu AVC. Valorile S-100 se corelează semnificativ cu severitatea deficitului neurologic și cu mărimea zonei de infarct cerebral. În traumatismele cerebrale se corelează cu severitatea leziunii. Ca marker tumoral este folosită în:

- tumori primare și metastaze (neurinom, glioblastom, astrocitom, meningiom);
- monitorizarea melanomului malign.

Nivelul S-100 se corelează exact cu stadiul clinic al melanomului malign și este folosit ca factor de prognostic (Tabelul 23. XXIV). Totuși acest marker nu trebuie utilizat ca test de screening sau diagnostic pentru melanomul malign.

Tabelul 23.XXIV Valoarea prognostică a S-100

Concentrația S-100 ($\mu\text{g/L}$)	Supraviețuire la 3 ani (%)
$< 0,3$	85%
0,3-0,6	50%
$> 0,6$	10%

S-100 este folosită și pentru monitorizarea terapiei melanomului și pentru detectarea recăderilor tumorale.

Recent s-a observat o asocierie strânsă a acestei proteine cu cardiomiopatia și unele boli neurodegenerative.

23.9 DETERMINAREA MARKERILOR TUMORALI

23.9.1 RECOLTAREA SI STOCAREA

Recoltarea și stocarea corectă a materialelor biologice este esențială pentru ca rezultatele analizelor să fie corecte.

Recoltarea:

- Se face dimineața pe nemâncate.
- Sângele se recoltează ca atare, fără aditivi.
- Se recoltează 10 ml de sânge din venele cubitale. Trebuie evitată aplicarea prelungită a garoului înainte de recoltarea sângelui.
- Sângele poate fi stocat la temperatura camerei maxim 1-2 ore.

Stocarea:

- Sângele coagulat trebuie centrifugat și serul trebuie transferat în 2-3 criotuburi, care pot fi închise. În ser nu trebuie să rămână hematii.
- Aceste probe pot fi stocate la 4°C 4-5 zile sau la temperatura de -20°C, pentru câteva săptămâni.
- Pentru determinarea markerilor tumorali probele sunt decongelate la temperatura camerei (1-2 h) și omogenizate. Proba odată decongelată nu mai poate fi recongelată. După decongelare proba poate fi stocată 4-5 zile la temperatura de 4°C.

Important!

Analizele nu pot fi făcute din probe biologice cu hemoliză și/sau lipemie.

23.9.2 METODE DE ANALIZĂ

Metodele utilizate pentru determinarea markerilor tumorali trebuie să îndeplinească următoarele cerințe:

- Specificitate;
- Sensibilitate;
- acuratețe, reproductibilitate;
- variația în timpul determinării: < 5%;
- variația între determinări: < 10%.

Determinarea de rutină a markerilor tumorali este făcută cu metode imunochimice și cromatografice. Principiul acestor metode: reacția antigen-anticorp. Specificitatea este asigurată de anticorpii folosiți. Sunt folosiți anticorpii monoclonali care au o serie de avantaje:

- specificitate de antigen;
- nu apare imunoabsorbție;

- sunt standardizați;
- interval de măsurare larg.

Metodele moderne de imunochimie pot fi automatizate. De obicei anticorpul este legat în faza solidă. Aici se formează complexe imune, iar excesul de reactivi este îndepărtat prin spălare.

Tehnici de marcarea: Cantitatea de complexe imune poate fi determinată dacă anticorpul sau antigenul din complex se marchează cu o substanță care emite un semnal care apoi este măsurat.

Substanța cu care se marchează anticorpul trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să emită un semnal stabil, ușor de măsurat;
- să lege atât moleculele mici, cât și pe cele mari;
- să nu modifice în nici un fel legătura antigen-anticorp.

Substanțele folosite pentru marcarea:

a. metode radioimunochimice (RIA) - folosesc izotopii radioactivi (^{125}I). Intensitatea radioactivității este proporțională cu concentrația substanței cercetate.

Avantajul metodei: sensibilitatea crescută;

Dezavantajele metodei:

- timp de expirare scurt al reactivilor;
- costuri ridicate;
- nu poate fi automatizată;
- dezavantajele radioactivității.

b. metode imunochimice – care nu folosesc izotopii ca markeri

Folosesc:

- enzime – EIA (enzymatic immunoassay);
- substanțe fluorescente – FIA (fluorescent immunoassay);
- substanțe luminescente – LIA (luminescent immunoassay).

23.9.3 ASIGURAREA CALITĂȚII

Depinde de metoda analitică folosită și de activitatea laboratorului. Deci asigurarea calității cuprinde faza analitică, dar și fazele pre- și postanalitice (recoltarea, stocarea, înregistrarea probelor, interpretarea rezultatelor etc.). Laboratoarele care determină markerii tumorali trebuie să efectueze controalele interne și externe de calitate.

Factori care afectează rezultatele:

- erori privind recoltarea, transportul sau stocarea probelor;
- efectul Hook al concentrațiilor mari: în cazul metodelor moderne de imunochimie apare la concentrații de peste 50000 U/mL;
- efectul anticorpilor heterofili poate să apară în următoarele cazuri: mușcătura de șobolani sau alte animale (ex.: la îngrijitorii de animale) sau la bolnavii care au făcut terapii imune.

23.9.4 CRITERII DE ALEGERE ȘI VALIDARE

Sensibilitatea unei metode este calitatea acesteia de a pune în evidență chiar și cantități foarte mici din substanța de analizat ("de a nu da rezultate fals negative" - **FN**).

Specificitatea unei metode de analiză este capacitatea acesteia de a evidenția (semnala) doar parametrul de analizat („de a nu da rezultate fals pozitive” - **FP** - sau „de a da un rezultat real negativ - **RN** - dacă parametrul nu se găsește în proba de analizat”) (Figura 23.7).

Tabelul de contingență al acestor doi parametri este redat în Figura 23.8.

Pentru aprecierea cantitativă a performanței unei metode diagnostice este necesară explicarea și calcularea parametrilor:

- sensibilitatea (**Se**) unui test diagnostic - este probabilitatea ca un individ bolnav să aibă rezultatele testului pozitive:

$$Se = [RP / (RP + FN)] \times 100$$

sau

$$Se = \frac{\text{nr. cazurilor cu valori anormale ale markerilor tumorali}}{\text{nr. total al cazurilor de cancer}} \times 100$$

Depinde de stadiul bolii și de valoarea „cut off”.

- specificitatea (**Sp**) unui test diagnostic - este probabilitatea ca un individ fără boala respectivă să aibă rezultatele testului negative:

$$Sp = [RN / (RN + FP)] \times 100$$

sau

$$Sp = \frac{\text{nr. cazurilor cu valori anormale ale markerilor tumorali}}{\text{nr. total al cazurilor fără cancer}} \times 100$$

- rata fals negativă (**RFN**) - este probabilitatea ca un individ bolnav să aibă rezultatele testului negative:

$$RFN = [FN / (FN + RP)] \times 100;$$

- rata fals pozitivă (**RFP**) - este probabilitatea ca un individ fără boala respectivă să prezinte rezultate pozitive ale testului:

$$RFP = [FP / (FP + RN)] \times 100;$$

- valoarea predictivă pozitivă (**VPP**), sau probabilitatea posttest, este probabilitatea ca un individ cu valori pozitive ale testului să prezinte boala (= Specificitate crescută a testului):

$$VPP = [RP / (RP + FP)] \times 100$$

sau

$$VPP = \frac{\text{nr. cazurilor cu valori anormale reale}}{\text{nr. total al cazurilor cu valori anormale}} \times 100$$

- valoarea predictivă negativă (**VPN**) - este probabilitatea ca un individ cu valori negative ale testului să nu aibă boala (= Sensibilitate crescută a testului):

$$VPN = [RN / (RN + FN)] \times 100$$

sau

$$VPN = \frac{\text{nr. cazurilor cu valori normale reale}}{\text{nr. total al cazurilor cu valori normale}} \times 100$$

- acuratețea globală a testului (**AG**) - este probabilitatea globală ca valorile pozitive sau negative ale testului să identifice corect prezența sau absența bolii:

$$AG = [(RN + RP) / (RN + RP + FN + FP)] \times 100$$

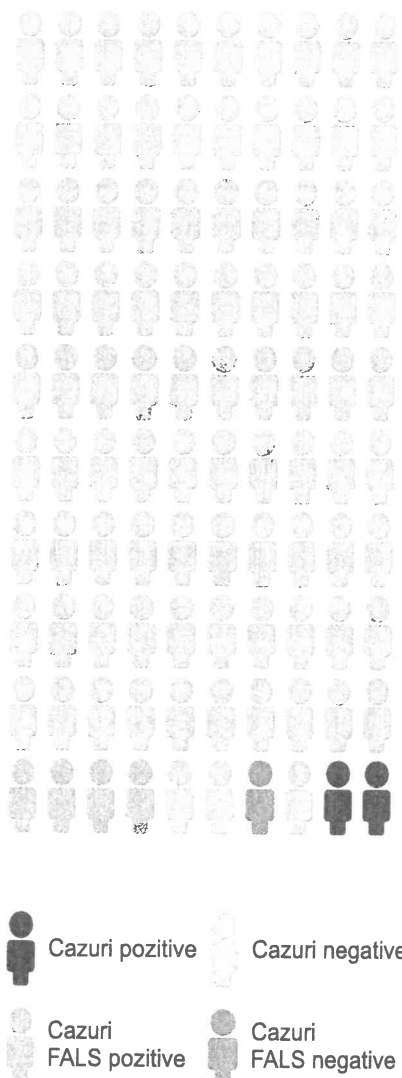


Figura 23.7 Valoarea markerilor tumorali în screening-ul cancerului

		Tumora		Total
		Prezentă	Absentă	
Rezultatele testului markerului tumoral	Pozitiv	RP (Real pozitiv)	FP (Fals pozitiv)	RP+FP
	Negativ	FN (Fals negativ)	RN (Real negativ)	FN+RN
Total		RP+FN	FP+RN	

Figura 23.8 Diagramă decizională - tabelul de contingență între prezența tumorii și prezența markerului tumoral

Caracteristicile unui marker tumoral ideal sunt:

- sensibilitate 100% - capacitatea de a identifica toți pacienții cu tumoră, în stadiu cât mai precoce; specificitate 100% - capacitatea de a discrimina între indivizii sănătoși și cei cu neoplazii;
- specificitate de organ – capacitatea de a localiza tumora;
- corelație între concentrația serică a markerului și stadiul tumorii;
- capacitatea de a indica modificările induse de tratament;
- capacitate prognostică în funcție de concentrație.

Valoarea cut off: este o valoare a concentrației la care sensibilitatea și specificitatea metodei sunt optime. De obicei corespunde concentrației la care specificitatea este de minimum 80% (Figura 23.9).

Diagramele sensibilitate – specificitate (cunoscute sub numele de curbe ROC – Receiver Operating Characteristics) sunt indicatori utili ai valorii diagnostice a unui marker tumoral (Figura 23.10 și Tabelul 23.XXVI).

23.9.5 FACTORI BIOLOGICI CARE POT INFLUENȚA CONCENTRAȚIA MARKERILOR TUMORALI

Încă nu există un marker tumoral ideal sau un test universal de detectare a cancerului cu sensibilitatea de 100%, deoarece nu există nici un marker tumoral care să fie sintetizat exclusiv de țesutul tumoral și care să nu fie detectabil în concentrații mai mici și la persoane sănătoase sau cu boli benigne.

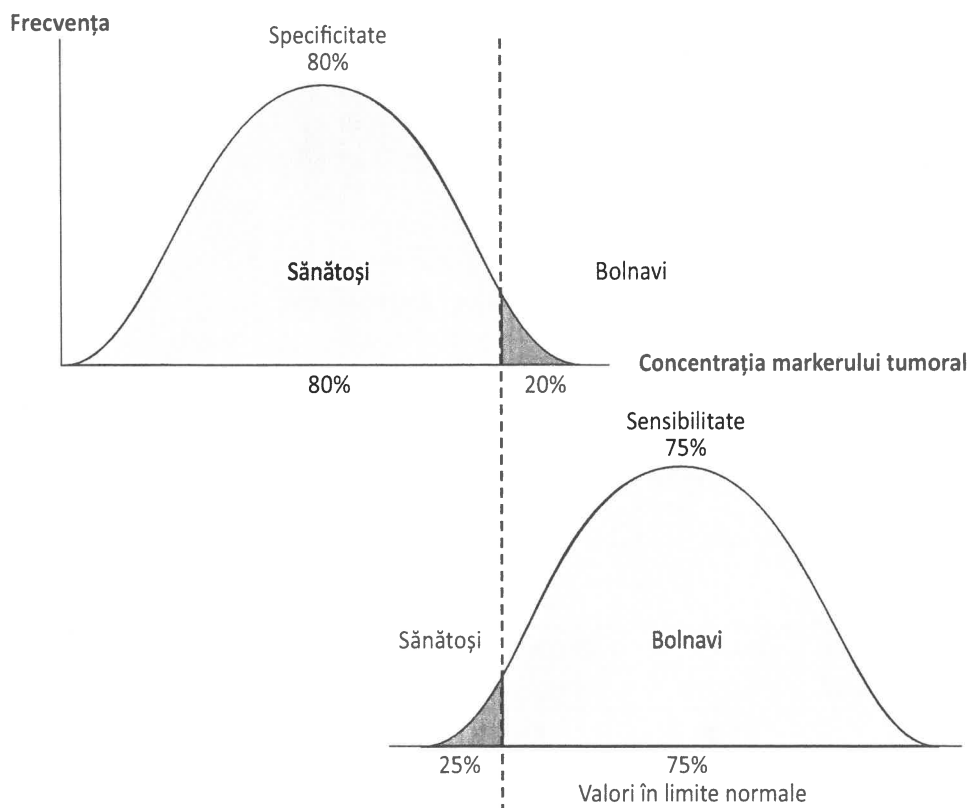


Figura 23.9 Stabilirea valorii *cut-off* în funcție de specificitatea și sensibilitatea testului

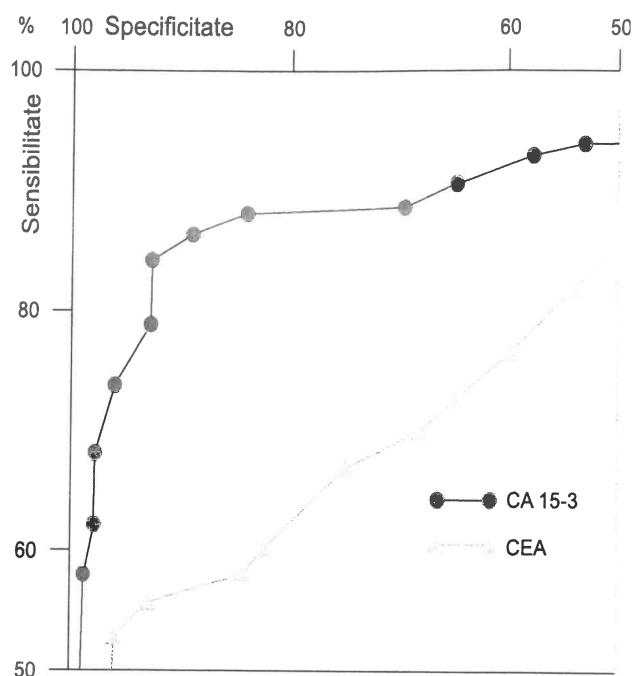


Figura 23.10 ROC (Receiver Operating Characteristics) pentru doi markeri tumorali în carcinomul mamar

Concentrația markerilor tumorali poate fi influențată de următorii factori (în afara de prezența sau absența procesului malign):

1. Factorii care pot cauza rezultate fals pozitive:

- boli benigne, în primul rând boli inflamatorii degenerative;
- boli hepatice (AFP, CA 15-3, CA 19-9, CEA, TPA);
- boli renale ($\beta 2\text{mg}$, CA 15-3, CA 19-9, calcitonina, CEA, PSA);
- tratamente (intervenții chirurgicale, chimio-radioterapie, necroza tumorală, liza tumorală);
- sarcina (AFP, CA 125, HCG), menstruația (CA 125);
- trecerea dintr-o secreție fiziologică în sânge (ex: CA 125 din lapte);
- medicamente (calcitonina, catecolamine etc.);

2. Factorii care pot cauza rezultate fals negative:

- numărul scăzut al celulelor maligne care sintetizează markerul respectiv;
- markerul tumoral rămâne în celulă sau pe suprafața celulei (nu este excretat);
- formează complexe imune cu anticorpi circulanți;
- sinteza de marker tumoral este blocată (ex: persoane cu antigene Lewis negative nu sintetizează CA 19-9);

Tabelul 23.XXVI Criterii de alegere a markerilor tumorali

Sensibilitate	Specificitate	Utilitate
> 90% (foarte bună)	> 70% (bună)	Monitorizare sau screening persoane la risc
> 90% (foarte bună)	< 30% (slabă)	Monitorizare
< 40% (slabă)	> 80% (bună)	Monitorizare ?!

- vascularizarea slabă a țesutului tumoral – markerul tumoral nu ajunge în circulația sanguină;
- viteza crescută de metabolizare sau excreție;
- alegerea „greșită” a markerului. Celula malignă sintetizează un alt marker tumoral. Sinteza de marker tumoral este modificată de obicei de o mutație, de metastaze sau de terapie.

23.9.6 ANALIZE MULTIPARAMETRICE

Determinarea simultană a mai multor markeri tumorali are unele avantaje: detectează mai devreme și mai precis tumorile sau recidiva, ajută la identificarea unor grupuri de pacienți care necesită terapii diferite, astfel cresc semnificativ șansele terapeutice.

Determinarea mai multor markeri tumorali este necesară în următoarele situații:

- când tumorile sintetizează mai mulți markeri (ovar, tiroidă, plamâni, colon etc.);
- când țesutul tumoral nu secretă nici un marker tumoral într-o cantitate mare.

23.10 EVALUAREA CLINICĂ

O serie de noi markeri tumorali sunt descoperiți de la un an la altul. Din păcate, nici unul dintre markerii tumorali discutați mai sus nu îndeplinește întru totul criteriile pentru un marker ideal. Nici unul nu este suficient de sensibil sau specific pentru a putea fi utilizat în screening-ul precoce al bolii. În continuare există anumite tipuri de tumori care, chiar în formă avansată, nu produc markeri, în ciuda faptului că sunt de dimensiune mare și metastazează.

23.10.1 SCREENING

Screeningul cancerului de prostată. Grupul cu risc crescut al cancerului de prostată cuprinde în primul rând bărbații cu vârste între 50 și 70 de ani. La acest grup screening-ul descoperă 3-4 cazuri de cancer la fiecare 100 de persoane examinate. Cazurile de cancer pot fi descoperite cu 5 ani mai devreme de apariția primelor semne clinice.

Screening-ul cuprinde 3 metode de diagnostic:

- determinarea antigenului specific prostatei (PSA); cu o valoare cut off a PSA de 4 ng/mL sensibilitatea și specificitatea sunt de 87%;
- examen clinic (tușeul rectal);
- examen ultrasonografic transrectal

În grupuri cu risc crescut selecționate pot fi efectuate următoarele screening-uri:

- Tumori germinale: AFP, HCG;
- Neuroblastom (sub vârsta de 2 ani): AVM, NSE, HVA (Acid Homovanilinic).

23.10.2 DIAGNOSTIC PRIMAR

Markerii tumorali pot facilita stabilirea diagnosticului oncologic primar; scad numărul examinărilor costisitoare și a celor invazive periculoase (Tabelul 23.XXVII).

Tabelul 23.XXVII Markerii tumorali de primă linie recomandați în neoplazii.

Tumori	Markerii tumorali
Hepatică primar	AFP, CEA
Germinale	AFP + HCG
Prostată	PSA
Gastrică	CA 72-4, CEA, TPA
Pulmonară cu celule mici	NSE, TPA, CEA
Pancreatică	CA 19-9, TPA
Ovariană	CA 125, TPA, CA 72-4
Vezica urinară	TPA
Colo-rectală	CEA, TPA, CA 19-9
Neuroblastom	AVM, HVA
Tiroidiană	Tireoglobulina, Calcitonina

23.10.3 MONITORIZAREA TRATAMENTULUI SI EVOLUTIEI BOLII

Acestea sunt cele mai importante indicații ale markerilor tumorali. Markerii tumorali pot indica recidiva tumorii cu mai multe luni înainte de apariția simptomelor clinice.

1. Descreșterea concentrației markerului tumoral după tratament în 4-8 săptămâni (în funcție de timpul de înjumătățire) până la valori normale indică:

- îndepărtarea totală a tumorii (după operație);
- remisia sau scăderea volumului tumorii (după chimio- sau radioterapie).

2. Concentrația markerului tumoral scade cu mai puțin de 20%, persistă valorile patologice sau chiar continuă să crească (cu peste 20 %) indică:

- tumoră reziduală sau metastaze (după operație);
- tratament parțial eficient (după chimio- sau radioterapie).

3. Concentrația markerului tumoral prezintă o continuă creștere după o perioadă de normalizare, indică:

- recidivă (creșterea lentă a valorilor);
- metastaze (creșterea rapidă a concentrației markerului tumoral);
- rezistența la terapie, liza sau necroza tumorală (imediat după începerea tratamentului chirurgical, citostatic sau radiologic);
- tulburări în catabolizarea sau eliminarea tumorii (ex: tulburări renale sau hepatice cauzate de chimioterapie).

Metastazele tumorii primare pierd frecvent capacitatea de a sintetiza markerul tumoral ceea ce poate cauza rezultate fals negative.

Este indicată măsurarea markerilor tumorali în următoarele situații:

- înainte de începerea tratamentului;
- la 2-10 zile de la începerea tratamentului în funcție de timpul de înjumătățire al markerului tumoral; apoi lunar în primele 3-6 luni; în următorii 1-2 ani: de 4 ori / an; în următorii 3-5 ani: de 2 ori/an; în următorii ani: anual;

- dacă există suspiciunea de recidivă sau metastază, sau dacă apar simptome / semne clinice;
- înainte de schimbarea tratamentului;
- pentru stabilirea stadiului bolii;
- dacă concentrația markerului tumoral crește sau arată valori patologice: la 2-3 săptămâni.

23.11 RECOMANDĂRI PENTRU UTILIZAREA MARKERILOR TUMORALI

23.11.1 CANCERUL HEPATIC

La majoritatea pacienților, cancerul hepatic cauzează creșterea nivelului seric de α -feto-proteină (AFP).

Pentru depistarea precoce a carcinomului hepatocelular la pacienții cu risc crescut, în special cei cu ciroză hepatică datorată infecției cu virus hepatitic B sau C, ghidurile recomandă efectuarea, în scop de screening, la interval de 6 luni, a AFP și a ultrasonografiei abdominale.

Concentrații de AFP $> 20 \mu\text{g/L}$ care sunt în continuuă creștere trebuie să conducă la efectuarea de investigații suplimentare chiar dacă nu se evidențiază nimic suspect la ultrasonografia abdominală.

În combinație cu alți factori de prognostic concentrația AFP poate oferi informații prognostice la pacienții cu carcinom hepatocelular tratați și la cei care vor fi supuși rezecției hepatice, concentrații mari indicând un prognostic mai prost.

Pentru monitorizarea eficacității tratamentului, cursului bolii și depistarea recurențelor este recomandată efectuarea de dozări seriate a AFP serice (la pacienții care au avut nivele crescute înainte de tratament). Deși intervalele de monitorizare nu sunt clar stabilite până în acest moment, practica clinică sugerează urmărirea pacienților o dată la 3 luni timp de 2 ani și apoi o dată la 6 luni.

AFP este singurul marker tumoral recomandat pentru supravegherea pacienților cu carcinom hepatocelular sau pentru cei aflați la risc.

23.11.2 CANCERUL PANCREATIC

Nici un marker tumoral nu este perfect pentru screening-ul cancerului pancreatic.

Majoritatea pacienților cu această afecțiune prezintă nivele serice crescute de CA 19-9. O valoare crescută a acestuia se corelează cu o probabilitate înaltă de existență a metastazelor. Deși CA 19-9 oferă informații despre evoluția și prognosticul bolii, acest marker nu poate fi utilizat pentru a diagnostica neoplasmul pancreatic.

23.11.3 CANCERUL GASTRIC

Nici unul din markerii tumorali disponibili nu este recomandat pentru screeningul și diagnosticul acestui tip de cancer. Unii markeri tumorali digestivi cum ar fi CEA, CA 72-4 și CA 19-9 pot fi dozați în dinamică pentru evaluarea eficacității tratamentului dacă la momentul diagnosticului au avut valori crescute.

23.11.4 CANCERUL COLORECTAL

Nu se recomandă utilizarea nici unui marker seric din cei disponibili (CEA, CA19-9, CA 242, TIMP-1) pentru screeningul cancerului colorectal.

Concentrațiile preoperatorii ale CEA au valoare prognostică.

Valorile mari preoperatorii ale CEA trebuie să revină la normal în 4-6 săptămâni după intervenția chirurgicală, dacă întreaga masă tumorală a fost îndepărtată.

În ceea ce privește monitorizarea postoperatorie, la pacienții cu cancer colorectal stadiu II și III, nivelul CEA ar trebui măsurat o dată la 3 luni cel puțin trei ani de la diagnostic pentru depistarea precoce a recurențelor sau a bolii metastatice.

CA 19-9 și CA 242 au o sensibilitate mai mică comparativ cu CEA.

Date preliminare sugerează că concentrațiile preoperatorii ale CA19-9 și CA 242 au valoare prognostică în cazul pacienților cu cancer colorectal. Nu se recomandă însă dozarea de rutină a acestor markeri tumorali.

Un marker tumoral promițător pare a fi TIMP-1 (*Tissue inhibitor of metalloproteinases type 1*). Studiile preliminare sugerează ca acesta ar putea fi mai sensibil decât CEA în detectarea cancerului colorectal timpuriu și poate fi un factor de prognostic independent pentru cancerul colorectal.

23.11.5 CANCERUL MAMAR

Nici un marker tumoral seric nu poate fi folosit pentru screening-ul sau diagnosticul cancerului mamar în stadiu incipient.

În momentul diagnosticului unui cancer mamar, prezența sau absența receptorilor pentru estrogen și progesteron trebuie investigată, scopul fiind identificarea pacienților care pot fi tratați cu terapie hormonală. În combinație cu alți factori de prognostic, receptorii de estrogen și progesteron pot fi utili în stabilirea prognosticului pe termen scurt la pacienții nou diagnosticați.

Se recomandă de asemenea măsurarea HER2 la toți pacienții cu cancer mamar invaziv pentru identificarea acelor care pot fi tratați cu trastuzumab.

La pacienții cu forme avansate de cancer se pot folosi CA 15-3 și CEA pentru evaluarea periodică și depistarea recurențelor după administrarea tratamentului. Se mai poate folosi și testul CA 27.29 care măsoară același marker ca și CA 15-3 dar într-un mod diferit. S-a observat că CA 15-3 și CA 27.29 au o sensibilitate mai mare decât CEA. Descreșterea valorilor de CA 15-3 indică succesul terapeutic.

23.11.6 CANCERUL OVARIAN

Cancerul ovarian epitelial (cea mai frecventă formă de cancer ovarian) este însoțit de nivele crescute ale CA 125. Uneori pot fi determinați și alți markeri: CA 72-4, CEA și LASA-P (*Lipid Associated Sialic Acid in Plasma*).

Chiar și în stadiile avansate, cancerul ovarian este greu de vizualizat prin investigații radiologice. Din acest motiv adesea se folosește CA 125 pentru evaluarea răspunsului la tratament și depistarea recurențelor.

În prezent nu se recomandă testarea CA 125 pentru screening-ul cancerului ovarian deoarece acesta nu poate depista prezența afecțiunii maligne suficient de precoce pentru a obține îmbunătățirea prognosticului ad vitam.

În tumorile ovariene cu celule germinale se observă valori crescute ale hCG și/sau AFP. Acești markeri sunt folosiți în diagnosticul și evaluarea pacienților pe termen lung.

23.11.7 BOALA TROFOBLASTICĂ GESTAȚIONALĂ

Tumorile trofoblastice includ *sarcina molară* și *coriocarcinomul*. hCG este crescut în aceste tumori și poate fi folosit pentru depistarea cancerelor la femeile care deși nu sunt însărcinate prezintă uterul mărit. De asemenea, în timpul tratamentului pentru boala trofoblastică răspunsul terapeutic poate fi evaluat folosind hCG.

23.11.8 CANCERUL TESTICULAR

Aproximativ 95% din tumorile testiculare maligne sunt tumori cu celule germinale. Tumorile cu celule germinale ale adolescentului și adultului sunt clasificate în două mari tipuri: seminoame și tumori germinale non-seminomatoase.

AFP, hCG și LDH sunt markeri serici importanți în managementul pacientului cu cancer testicular având rol în diagnostic, prognostic, stadializare și monitorizare.

În seminoame se pot întâlni creșteri ale hCG și LDH (AFP are valori normale) în timp ce în tumorile germinale non-seminomatoase pot avea valori serice crescute unul sau mai mulți din cei trei markeri (AFP, hCG și LDH).

În situația în care se ridică suspiciunea de cancer testicular, determinarea preterapeutică celor trei markeri este obligatorie.

Determinarea concentrațiilor serice ale celor trei markeri este obligatorie și pentru stadializare.

În cazul în care există nivele preterapeutice crescute ale AFP, hCG și/sau LDH, după terapie, acestea trebuie monitorizate săptămânal până când concentrațiile ajung în intervalul biologic de referință. Nivelele markerilor tumorali care depășesc după terapie limita superioară a intervalului biologic de referință sugerează existența bolii reziduale care trebuie confirmată sau exclusă prin alte metode.

Monitorizarea seriata a hCG, AFP și a LDH este recomandată chiar și atunci când nivele preterapeutice ale acestor markeri nu sunt crescute datorită faptului că expresia acestora se poate modifica pe parcursul terapiei. Datorită faptului că nivele de baseline sunt diferite de la un individ la altul creșterile sunt mai importante decât valorile absolute.

23.11.9 CANCERUL PROSTATIC

PSA reprezintă markerul tumoral cel mai frecvent utilizat pentru screeningul cancerului de prostată.

Evaluarea nivelelor serice ale PSA joacă un rol cheie în toate aspectele managementului cancerului de prostată de la supraveghere la alegerea tratamentului optim, evaluarea prognosticului și la monitorizarea post-terapeutică.

O singură valoare crescută a PSA trebuie întotdeauna verificată prin-o retestare efectuată dintr-o proba nou recoltată. Această atitudine ar putea reduce substanțial biopsiile inutile.

După prostatectomia radicală, PSA ar trebui să scadă până la nivele nedetectabile. Valori persistent crescute indică prezența bolii reziduale.

Pacienții supuși radioterapiei ar trebui să prezinte o scădere semnificativă a nivelului PSA, însă poate dura mai mulți ani până când nivelul acestuia ajunge la valori normale.

Creșterea concentrației PSA după tratament indică recurența bolii.

Cancerul prostatic cu celule mici (o formă rară de cancer), care deține proprietăți neuroendocrine, nu produce creșterea nivelelor serice ale PSA și nici nu răspunde la terapia hormonală. Bărbații cu acest tip de cancer pot avea concentrații crescute ale *cromograninei A*.

23.11.10 CANCERUL DE VEZICĂ URINARĂ

Până în acest moment, nu se recomandă utilizarea nici unui marker tumoral pentru diagnosticul de rutină și managementul clinic al cancerului de vezică urinară. Acesta include diagnosticul diferențial, evaluarea prognosticului, stadializarea bolii și monitorizarea pacienților pentru detecția timpurie a bolii recurente.

Pentru stabilirea unui diagnostic la pacienții simptomatici se poate folosi BTA și NMP22 împreună cu cistoscopia. Aceste teste mai pot fi utilizate pentru urmărirea evoluției pacienților după administrarea tratamentului. Totuși, testele standard atât pentru diagnostic cât și pentru urmărirea pe termen lung a pacientului sunt încă cistoscopia și examenul citologic al urinei. Determinarea valorilor BTA și NMP22 se face adesea între cistoscopii. Dacă aceste valori sunt normale, cistoscopia se poate efectua mai rar. Trebuie subliniat faptul că dozarea BTA și NMP22 nu poate înlocui cistoscopia și examenul citologic.

În cazul unor forme avansate ale cancerului de vezică urinară pot crește și alți markeri: CEA, CA 125, CA 19-9 sau TPA. Aceștia pot fi folosiți pentru evaluarea pacientului în timpul și după tratament.

23.11.11 CANCERUL PULMONAR

Nici un marker tumoral nu și-a dovedit eficiența ca test de screening pentru cancerul pulmonar.

În cancerul pulmonar cu celule mici crește nivelul de NSE, iar în cancerul non-parvicelular găsim valori crescute al CEA. Acești markeri pot fi folosiți pentru evaluarea răspunsului terapeutic. Există și alți markeri care ar putea fi folosiți pentru evaluarea pacienților cu cancer pulmonar, însă de cele mai multe ori radiografia toracică sau alte teste imagistice transează diagnosticul.

23.11.12 MELANOMUL MALIGN

Din păcate nici un marker tumoral nu poate depista această afecțiune în stadii incipiente. TA-90, S-100 și alți markeri pot fi utilizați pentru stabilirea diagnosticului pozitiv de melanom malign dintr-un fragment tisular. Nivele serice crescute ale TA-90 pot sugera utilitatea de-

terminărilor secundare, însă cu o specificitate scăzută, concentrații ridicate putând fi găsite și în absența melanomului metastazat.

23.11.13 MIELOMUL MULTIPLU

Nu există markeri tumorali care pot fi utilizați pentru screening-ul acestei afecțiuni. Totuși identificarea imunoglobulinelor patologice este un test folositor în stabilirea diagnosticului. Prin electroforeza și imunofixare se pot pune în evidență aceste imunoglobuline atât în sânge cât și în urină. La pacienții cu mielom multiplu pot fi detectate fragmente imunoglobulinice în urină (lanțuri ușoare libere κ sau λ), denumite *proteine Bence-Jones*. În același timp majoritatea pacienților prezintă nivele serice detectabile ale unui tip de imunoglobulină patologică denumită *proteină monoclonală* sau *proteina M*. Prezența acestora duce la apariția unui *gradient monoclonal* pe traseul electroforetic. Deși prezența acestor proteine poate ridica suspiciunea unui mielom multiplu, pentru confirmarea diagnosticului este necesară o biopsie medulară.

Mulți dintre pacienții cu mielom multiplu prezintă nivele crescute ale β_2 -mg. Acest marker, împreună cu testele menționate mai sus, pot oferi date despre eficiența terapeutică și prognosticul pacienților.

23.11.14 CANCERUL DE COL UTERIN

Nici unul din markeri tumorali disponibili până în acest moment nu sunt recomandați pentru screening-ul sau diagnosticul cancerului de col uterin.

Antigenul carcinomului cu celule scuamoase (SCC – squamous cell carcinoma antigen) nu este suficient de sensibil sau specific pentru a putea fi utilizat în screenigul acestui tip de cancer. În toate cazurile diagnosticul se bazează pe examenul histopatologic.

În cazul cancerului de col cu celule scuamoase (cel mai frecvent tip histologic de cancer – 85%), SCC reprezintă markerul de elecție.

S-a demonstrat că concentrațiile serice ale SCC se corelează cu stadiul și mărimea tumorii, boala reziduală, recurentă sau progresivă precum și cu supraviețuirea pacienților cu cancer de col cu celule scuamoase.

Antigenul carcinoembrionar și CA 125 pot fi utili la pacienții cu adenocarcinom cervical.

23.12 PROTEOMICA. UN NOU NIVEL DE ÎNȚELEGERE A MALIGNITĂȚII

În timp ce ADN este doar o arhivă informațională, activitatea celulei este susținută de proteine. Existența unei anumite secvențe ADN nu garantează sinteza proteinei corespunzătoare. În același timp, secvența ADN nu este suficientă pentru a descrie structura proteică, funcția și localizarea celulară. Versatilitatea și complexitatea proteică rezidă din modificările posttranslaționale (fosforilare, sulfatare, glicozilare). Mai mult, codul genetic nu oferă informații despre modul în care proteinele formează rețele și mecanisme funcționale în cadrul unei celule. De fapt, activarea unei căi de transmitere a unui semnal care comandă migrarea celulară,

apoptoza sau diviziunea, poate avea loc instantaneu înainte ca o modificare în expresia ADN/ARN să se poată produce.

Termenul de *proteom*, care caracterizează totalitatea proteinelor codificate de *genom*, a fost propus în 1994. Proteomica este considerată etapa superioară *genomicii*. Unul dintre dezideratele actuale ale oamenilor de știință este să creeze o bază de date care să cuprindă toate proteinele. Până în prezent numai o mică parte a proteomului a fost prelucrată. Pentru analiza proteinelor nu există (nu s-a inventat încă) o metodă analitică de puterea și valoarea diagnostică a PCR pentru acizii nucleici, astfel încât progresele în acest domeniu se fac relativ lent. Deși comunitatea științifică a propus o serie de noi tehnici de investigație (cum ar fi tehnologia xMAP), metoda de elecție continuă să fie *electroforeza bidimensională în gel*. Aceasta separă proteinele în funcție de greutatea lor moleculară (pe o dimensiune) și încărcătura electrică (în a doua dimensiune). Când o soluție proteică este aplicată pe gelul bidimensional proteinele sunt separate în specii proteice alcătuite dintr-un singur tip de proteine. Aceste puncte de concentrare proteică de pe gelul de electroforeză pot fi analizate cantitativ pentru a monitoriza evoluția unei anumite proteine sub tratament.

23.12.1 CANCERUL LA NIVEL MOLECULAR

Cercetările din domeniul genomicii și proteomicii furnizează un nou nivel de informații funcționale despre bazele moleculare ale cancerului. Aceste informații vor constitui temelia unei noi ere a medicinei moleculare aplicată pentru cancer. Această revoluție a medicinei moleculare poate fi împărțită în trei faze:

- *Prima fază* este descoperirea genelor; în această fază au fost identificate și secvențiate gene anterior necunoscute. Cea mai mare realizare a acestei faze este finalizarea Proiectului Genomului Uman în 2003, după 50 de ani de la descoperirea dublului-helix ADN.
- *A doua fază* este *amprentarea* moleculară; aceasta corelează statusul *genomic*, *pattern-ul de expresie* al ADN complementar (ADNc – este ADN sintetizat din ARNm sub acțiunea revers-transcriptazei) și repertoriul proteic cu *statusul funcțional* al celulei sau țesutului. Prin studiul *pattern-urilor de expresie* se încearcă obținerea de informații despre molecule importante din punct de vedere funcțional pentru dezvoltarea patologiei umane. Aceste date mai pot fi folosite și în subclasificarea morfopatologică a tumorilor, ceea ce va asigura un tratament adecvat fiecărui pacient în parte.
- *A treia fază* constă în corelarea informațiilor proteomice cu circuitele și căile funcționale celulare. Pentru aceasta trebuie să luăm în considerare dinamica modificărilor proteice posttranslaționale și interacțiunile proteină-proteină sau proteină-ADN. Toate acestea permit o analiză la nivel molecular a tumorii pentru a identifica elementele care duc la tumorigeneză. Printr-o analiză genomică/proteomică integrată rezultatul final va fi înțelegerea funcțională a evenimentelor moleculare care stau la baza dezvoltării celulare normale și patologice. Acest nivel

înalt al înțelegerii funcționale va constitui baza unui design terapeutic cu adevărat rațional a cărui țintă sunt leziunile moleculare răspunzătoare de apariția bolii.

23.12.2 PROVOCĂRILE MEDICINEI MOLECULARE POST-GENOMICE

Secvențierea genomului uman a oferit posibilitatea înțelegerii mecanismelor genetice care stau la baza dezvoltării cancerului. Încheierea secvențierii genomului uman este doar începutul din ceea ce pare a fi o nouă eră în medicină. Mai puțin de 2% din bolile umane non-infecțioase sunt monogenice. Restul sunt poligenice (cauzate de mai multe gene în același timp) sau epigenice (cauzate de modificări non-genetice sau post-genetice ale moleculelor celulare). Așadar, elucidarea proteomului uman implică identificarea tuturor proteinelor și a posibilelor variații morfologice și funcționale ale acestora. Astfel o înțelegere completă a bazelor moleculare ale cancerului depinde de o abordare multidisciplinară combinând genetica, patologia, structura și funcția proteică, biologia celulară, bioinformatică și medicina clinică.

Genele exprimate în mod curent și elementele lor reglatoare reprezintă o mică proporție a genomului unei celule. Numărul total al genelor exprimate în timpul vieții poate fi de aproximativ 20000. Totuși, pentru o celulă, numărul genelor în uz curent este de aproximativ 4000. Dintre acestea numai o mică parte sunt susceptibile la acțiunea factorilor carcinogeni. Producția proteică ai genelor susceptibile pot fi reglatori ai unor căi de control a proliferării celulare, diferențierii sau apoptozei. Așadar, în vederea tipizării moleculare a cancerului este important să se identifice acel subset de gene aflate în corelație sau în relație de cauzalitate cu dezvoltarea și progresia cancerului.

Este foarte probabil ca majoritatea cancerelor să-și aibă originea în țesuturi cu un genom normal. Evenimentele carcinogenice produc modificări genetice (transmisibile pe cale ereditară), care dau naștere stărilor premaligne (hiperplazia și displazia) înaintea apariției cancerului propriu-zis. Identificarea modificărilor genetice importante, a genelor și proteinelor implicate cauzal, depinde de posibilitatea *analizei țesutului tumoral* combinată cu informații obținute prin folosirea *animalelor de experiență* și a *culturilor celulare*. În timpul progresiei somatice a cancerului la oameni, celulele tumorale acumulează un număr mare de mutații, translocații cromozomiale, deleții hetero- și homozigote, mutații punctiforme sau locusuri cu amplificare genică. Numai unele din aceste modificări (sau poate doar una singură) constituie elementul *trigger* necesar pentru creșterea, invazia și metastazarea tumorii. Așadar, cantitatea proteinelor, modificările posttranslaționale și asocierile proteină-proteină pot oferi o imagine de ansamblu asupra căii de conducere a semnalelor implicate în carcinogeneză. Această cale de transmitere a semnalului este cea mai bună țintă pentru terapia antitumorală.

23.12.3 COMPLEXITATEA PROBLEMEI

Proteomica este mai complexă decât genomica deoarece genomul unui organism rămâne constant, în timp ce proteomul diferă în funcție de timp și de la o celulă la alta.

Determinarea proteinelor se făcea în trecut analizând ARNm. Astăzi se știe însă că ARNm nu este întotdeauna translatat pentru a forma o proteină, iar cantitatea de proteine trans-

latate dintr-un ARNm, depinde de gena de pe care a fost transcris precum și de starea fiziologică a celulei.

Proteomica se ocupă de studiul calitativ al unei proteine (dacă este sau nu prezentă) și de cel cantitativ.

23.12.3.1 Modificări posttranslaționale

Posibile diferențe între proteinele codificate de aceeași genă rezultă încă din momentul translației ARNm, însă după acest proces, proteinele suferă și alte modificări de natură chimică. Cele mai multe dintre aceste modificări postranslaționale au un rol decisiv pentru funcțiile proteinelor la nivel celular.

Fosforilarea. Acest proces vizează numeroase enzime și proteine structurale responsabile de comunicarea inter- sau intracelulară. Adăugarea unor grupări fosfat unor aminoacizi (de regulă serină și treonină, prin intermediul serin- sau treonin-kinazei; mai rar tirozină cu ajutorul tirozin-kinazei), oferă proteinei capacitatea de a interacționa cu alte proteine, care pot recunoaște domeniul fosforilat.

Ubiquitinarea. Ubiquitina este o proteină de mici dimensiuni care poate fi asociată anumitor substrate proteice de către o familie de enzime denumite ubiquitin-ligaze E3. Determinarea proteinelor poli-ubiquitinate poate oferi informații despre mecanismele reglatoare ale căilor de transmitere implicate în sinteza proteică. De asemenea, determinarea substratelor fiecărei ubiquitin-ligaze coroborat cu cuantificarea expresiei genelor răspunzătoare de sinteza acestor ligaze în diferite celule se poate dovedi de un real folos.

Modificări adiționale. Pentru a discuta toate modificările care pot fi studiate în cadrul proteomicii ar trebui abordată cea mai mare parte a biochimiei. Așadar numai o parte vor fi enumerate: metilarea, acetilarea, glicozilarea, oxidarea și nitrozilarea. Unele proteine trec prin toate aceste modificări, adesea formând combinații dependente de timp, ceea ce complică și mai mult abordarea acestei probleme.

23.12.4 ANALIZA MOLECULARĂ FOLOSIND TEHNICA MICRODISECȚIEI TISULARE

Analiza moleculară a populațiilor celulare purificate din mediul tisular nativ, este țelul geneticii moderne. Atingerea acestui țel este dificilă deoarece țesuturile sunt structuri tridimensionale complicate alcătuite dintr-un număr mare de populații celulare distincte care interacționează într-un mod complex. Subpopulația celulară vizată poate reprezenta doar o fracțiune microscopică din țesutul prelevat. De exemplu, fragmentul bioptic din țesutul mamar care adăpostește o tumoră malignă, conține de obicei următoarele tipuri de celule:

- Celule adipoase din țesutul adipos abundent în jurul ductelor;
- Epiteliu normal și mioepiteliu din ducte;
- Fibroblaști și celule endoteliale din stromă și vasele sanguine;
- Celule carcinomatoase premaligne din leziunile *in situ*;
- Mănunchiuri de celule carcinomatoase.

Dacă dorim să analizăm modificările genetice din celulele premaligne și maligne, trebuie să știm că aceste subpopulații sunt de regulă localizate în regiuni microscopice care ocupă mai puțin de 5% din volumul țesutului analizat. Se știe însă că o contaminare a probei tisulare

cu alte celule va oferi date eronate în urma analizării cu aparatură automatizată. Cultivarea populațiilor de celule se face tocmai cu scopul de a reduce contaminarea. Însă celulele cultivate riscă să nu mai prezinte aceleași evenimente moleculare ca și cele care au loc în țesutul din care derivă. Chiar dacă se reușește izolarea și cultivarea celulelor respective în condiții optime, expresia genică poate fi foarte diferită în acest mediu de cultură. Asta se întâmplă pentru că celulele cultivate nu mai sunt în legătură cu anumiți factori responsabili de reglarea genică: factori solubili, molecule matriceale extracelulare, factori de comunicare intercelulară. Așadar, problema heterogenității celulare a fost o importantă barieră în calea analizei moleculare a țesutului normal și patologic. Această problemă poate fi acum soluționată prin dezvoltarea noilor tehnici de *microdisecție*.

Analiza genelor și a tiparelor proteice pentru țesutul cu dezvoltare normală și cel patologic se face prin microdisecția și extracția unei subpopulații omogene din mediul tisular, care poate fi apoi comparată cu alte subpopulații de celule adiacente dar distincte. În acest scop a fost dezvoltată tehnica microdisecției cu captură laser (*Laser Capture Microdissection* - LCM).

Tehnica LCM permite determinarea tiparelor de expresie pentru anumite gene. În acest scop se pot obține populații purificate de celule, din care se va extrage ARN, acesta va fi copiat pe ADNc și hibridizat ulterior. Folosind tehnica LCM una până la câteva mii de celule pot fi prelevate în mai puțin de 5 minute. Conformația proteică și activitatea enzimatică se păstrează dacă țesuturile sunt înghețate înaintea aplicării colorației, Astfel se poate obține pattern-ul de expresie genică pentru orice patologie identificabilă histologic. Folosind LCM în combinație cu metodele moderne de analiză (analiză mutațională, PCR în timp real) putem vizualiza interacțiunile tridimensionale dintre elementele constitutive ale țesutului examinat (Figura 23.11).

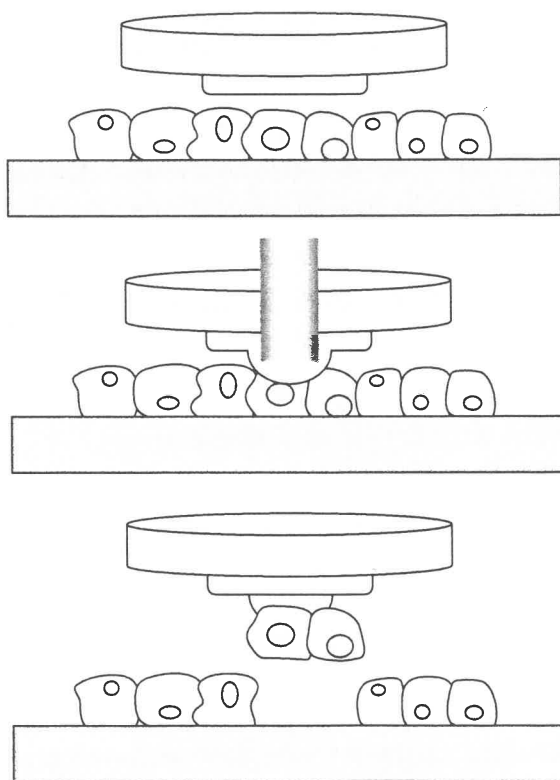


Figura 23.11 Reprezentarea schematică a microdisecției cu captură laser. LCM are rolul de a preleva subpopulații de celule în vederea analizei fără a le contamina cu alte celule. Se pot selecta celulele care urmează să fie studiate de pe ecranul calculatorului. Celulele alese sunt ascensionate cu ajutorul unei raze LASER. LASER-ul cu infraroșu montat pe axa optică a microscopului expandează un polimer termoplastic care ajunge pe lamă și capturează celula/celulele selectate de sub raza LASER. Când filmatul este ascensionat doar celulele selectate vor fi prelevate pentru studiu.

Bibliografie recomandată

1. Al-Azawi D., Kelly G., Myers E., McDermott E.W., Hill A., Duffy M.J., and Higgins N.O.: CA 15-3 is predictive of response and disease recurrence following treatment in locally advanced breast cancer. *BMC Cancer*. 2006; 6: 220
2. Agarwal PK, Black PC, Kamat AM. Considerations on the use of diagnostic markers in management of patients with bladder cancer. *World J Urol* 2008;26:39-44
3. Alles A. J., Warshaw A. L., Southern J. F., Compton C. C., and Lewandrowski K. B.: Expression of CA 72-4 (TAG-72) in the fluid contents of pancreatic cysts. A new marker to distinguish malignant pancreatic cystic tumors from benign neoplasms and pseudocysts. *Ann. Surg.* 1994 February; 219(2): 131–134.
4. American Cancer Society. Prevention and Early Detection. 2010 www.cancer.org
5. Barrows G. H., Anderson T. J., Lamb J. L., and Dixon J. M., "Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers," *Cancer*, 2009.
6. Bernardo H.L., Jeffrey W. C., Gregory Y.L., David P.R., Grenon N., Muzikansky A., and Zhu Long A.X.: term survivors with metastatic pancreatic adenocarcinoma treated with gemcitabine: a retrospective analysis. *J. Hematol Oncol.* 2009; 2: 13.
7. Catalona W.J., Partin A.W., Slawin K.M., et al: Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA* 1998;279:1542.
8. Chan D.W., Booth R.A., Diamandis E.P.: Tumor markers. In: Burtis C.A., Ashwood E.R., Bruns D.E., ed. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 3rd. ed. St.Louis:Elsevier Saunders; 2006:745-795
9. Chang K-H., Ryu H-S., Suk-Joon C., Young-Ji B., and Jung-Pil L.: Relationship between Pre-treatment Serum SCC (squamous cell carcinoma) Antigen, Cyfra 21-1 Levels, and Survival in Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. *Cancer Res Treat.* 2005 October; 37(5): 302-306
10. Chen C-Y., Su C-Y., Chien C-Y., Huang C-C., Chuang H-C., Fang F-M., Huang H-Y., Chen C-M., and Chiou S-J.: Overexpression of β 2-microglobulin is associated with poor survival in patients with oral cavity squamous cell carcinoma and contributes to oral cancer cell migration and invasion: *Br J Cancer*. 2008 November 4; 99(9): 1453–1461
11. Coffman L.G., Parsonage D., D'Agostino R., Torti Jr. F.M., and Torti S.V.: Regulatory effects of ferritin on angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 January 13; 106(2): 570–575
12. Colantonino D.A., Chan D.W.: The clinical application of proteomics. *Clin Chim Acta* 2005; 357:151-158
13. De Gennaro L., Brunetti N.D., Bungaro R., Montrone D., Cuculo A., Pellegrino P.L., Correale M., Di Biase M. Carbohydrate antigen-125: additional accuracy in identifying patients at risk of acute heart failure in acute coronary syndrome. *Coron Artery Dis.* 2009 Jun;20(4):274-80.
14. Demirci H., Erdamar H., Karakoc A., Akturk M., Yilmaz M., Arslan M.: CA 72-4 levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Clinical Practice*, Volume 64, Number 1, January 2010 , pp. 34-38(5)
15. Department of Clinical Biochemistry, Royal Infirmary of Edinburgh, Edinburgh EH3 9YW, United Kingdom. The National Academy of Clinical Biochemistry: Practice Guidelines and Recommendations for Use of Tumor Markers in the Clinic. (Laboratory Medicine Practice Guidelines), 2002, 40-42

16. DeVita V.Jr., Lawrence T., Rosenberg S.: *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 2008; 14-16
17. Diamandis E.P.: Tumor markers: past, present and future. In: Diamandis EP, Fritzsche HA, Lijia H, et.al. ed. *TumorMarkers. Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications*, Washington,DC: AACC Press; 2002:3-8
18. Duffy M. J. and Crown J. : A Personalized Approach to Cancer Treatment: How Biomarkers Can Help. *Clinical Chemistry*. 2008;54:1770-1779.
19. Duffy M.J.: Evidence for the clinical use of tumour markers. *Ann Clin Biochem* 2004;41:370-377
20. Gadducci A, Tana R, Cosio S, Genazzani AR. The serum assay of tumour markers in the prognostic evaluation, treatment monitoring and follow-up of patients with cervical cancer: a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:10-20
21. Grammatopoulos D., Elliott Y., Smith S. C., Brown I., Grieve R. J., Hillhouse E. W., Levine M. A., and Ringel M.D. : Measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood as an adjunctive test for monitoring thyroid cancer. *Mol Pathol*. 2003 June; 56(3): 162–166
22. Hayat M.A. :*Methods of Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis*, 2008, Vol.2:400-415.
23. Hayat M.A.: *Methods of Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis*. Vol.2, General methods and Overviews, Lung Carcinoma and Prostate Carcinoma; 2008: 38-39
24. Heizmann C.W., Fritz G., Schäfer B.W.: S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*. 2002 May 1;7:d1356-68
25. Howaizi M., Abboura M., Krespine C., Sbair-Idrissi M-S., Marty O., and Djabbari-Sobhani M.: A new cause for CA19.9 elevation: heavy tea consumption. *Gut*. 2003 June; 52(6): 913–914.
26. Hua X., Bingjian L., and Maode L.: The cancer secretome: a reservoir of biomarkers .J *Transl Med*. 2008; 6: 52. Published online 2008 September 17. doi: 10.1186/1479-5876-6-52
27. Louhimo J., Alfthan H., Stenman U., Haglund C.: Serum HCG and CA 72-4 Are Stronger Prognostic Factors than CEA, CA 19-9 and CA 242 in Pancreatic Cancer. *Oncology* 2004;66:126-131 (DOI: 10.1159/000077438)
28. Max J., Salunga R., Tuggle J.T., et al. : Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5974.
29. Nakata B., Takashima T., Ogawa Y., Ishikawa T. and Hirakawa K.: Serum CYFRA 21-1 (cytokeratin-19 fragments) is a useful tumour marker for detecting disease relapse and assessing treatment efficacy in breast cancer. *British Journal of Cancer* (2004) 91, 873 – 878
30. Pariente J. L., Bordenave L., Jacob F., Gobinet A., Leger F., Ferriere J. M., and Le Guillou M., "Analytical and prospective evaluation of urinary cytokeratin 19 fragment in bladder cancer," *J. Urol.*, vol. 163, no. 4, pp. 1116–9, Apr. 2000.
31. Shun Zhang, Yi-Ming Wang, Chuan-Dong Sun, Yun Lu, and Li-Qun Wu: Clinical value of serum CA19-9 levels in evaluating resectability of pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2008 June 21; 14(23): 3750–3753
32. Sturgeon C. M. and Diamandis E. P., "Use of Tumor Markers in Liver, Bladder, Cervical, and Gastric Cancers," *Lab. Med. Pract. Guidel.*, pp. 1–64, 2010.
33. Taira A., Merrick G., Wallner K., Dattoli M.: Reviving the acid phosphatase test for prostate cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2007 Jul;21(8):1003-10

34. Volk M.L., Hernandez J.C., Su G.L., Lok A.S., Marrero J.A.: Risk factors for hepatocellular carcinoma may impair the performance of biomarkers: a comparison of AFP, DCP, and AFP-L3. *Cancer Biomark.* 2007;3(2):79-87
35. Zhu H., Bilgin M., Snyder M.: *Proteomics. AnnuRevBiochem* 2003; 72:783-812

24

Mutațiile genice

Claudia Bănescu

24.1 INTRODUCERE

Termenul de "mutație" a fost introdus de către Hugo de Vries, care a emis și teoria mutaționistă, între anii 1900-1903. Mutația genetică este definită ca fiind o modificare în secvența ADN-ului și este prezentă la mai puțin de 1% de indivizi dintr-o populație.

Mutațiile pot duce la modificarea unei singure baze din structura ADN-ului sau pot interesa (prin deleții – pierderi de material genetic, sau duplicații – modificare cantitativă de material genetic caracterizată prin prezența în dublu exemplar a unui fragment cromozomial sau genic) unul sau mai multe nucleotide; zeci, sute, mii, sau chiar milioane de baze sau chiar fragmente cromozomiale sau cromozomi în întregime. Mutațiile pot interesa întreg genomul, putându-se produce fie la nivelul secvențelor codante (exoni), la nivelul intronilor (secvențe necodante) sau la nivelul situsurilor de matisare (adică la nivelul situsurilor de eliminare a intronilor; matisarea constând în excizia și eliminarea secvențelor necodante, a intronilor și unirea exonilor).

Cu toate acestea, nu toate secvențele de ADN sunt susceptibile la mutații. Majoritatea mutațiilor interesează doar câțiva perechi de baze (detectabile prin tehnici de diagnostic molecular bazate pe secvențierea nucleotidelor). Uneori mutațiile interesează fragmente mai mari, de sute sau mii de perechi de baze. Efectul mutațiilor diferă foarte mult. Astfel, în funcție de efectul fenotipic, avem: *mutații nefavorabile* (patogene, severe sau morbide) care determină modificări ale fenotipului; *mutații favorabile*, acestea au permis evoluția speciilor și apariția de specii noi, au produs o mai bună adaptare la mediu sau o rezistență la agresiunea factorilor de mediu și *mutații neutre*, localizate la nivelul regiunilor intergenice sau în secvențele netranslate ale genelor. Mutațiile neutre generează variantele alelice care alcătuiesc polimorfismul ADN-ului. În cazul în care frecvența unei variante (alele) este mai mică de 1% în populație atunci acestea sunt considerate *variante rare*.

În cazul în care anumite variante genetice sunt frecvente și apar la cel puțin 1% din populația generală, atunci ele se constituie ca *polimorfisme genetice*. Polimorfismele genetice asigură diversitatea și individualitatea fenotipică, pot fi localizate oriunde în genom, fie în interiorul genelor putând fi asociate cu modificări fenotipice, fie în regiunile intergenice. În unele situații polimorfismele genetice pot avea consecințe importante asupra sănătății

individului, putând determina predispoziția la o anumită boală sau pot modula răspunsul organismului la o anumită terapie.

Mutațiile sunt asociate frecvent cu un efect negativ asupra proteinei (pierderea sau câștig de funcție) și asupra caracterului fenotipic corespunzător, generând boli genetice.

Termenul de “mutație” se referă la genotip, adică la o modificare la nivelul ADN-ului sau la nivel cromozomial. Termenul de “mutant” se referă la fenotip. Fenotipul mutant depinde de modul în care mutația afectează produsul sau activitatea unei gene, și, de obicei, implică un caracter anormal sau neobișnuit.

Din punct de vedere al evoluției, mutațiile au fost esențiale pentru viață, deoarece au dus la apariția de indivizi cu fenotipuri variate care s-au adaptat schimbărilor din mediu înconjurător, inclusiv la boli.

24.2 CLASIFICAREA MUTAȚIILOR

În funcție de localizarea acestora, respectiv de tipul celulei afectate mutațiile pot fi: *germinale* (acestea sunt ereditare, apar cu o frecvență de 10^{-6} mutații/locus/generație, mutația se produce în timpul replicării ADN-ului care precede meioza, astfel se pot produce gameții anormali și mutația se poate transmite generației următoare, situație în care descendenții vor avea toate celulele mutante) sau *somatice* (apar în timpul replicării ADN-ului, etapă premergătoare unei diviziuni mitotice; nu se transmit la descendenți; sunt asociate cu apariția cancerelor, cu senescenta precocă; în acest caz descendenții unei celule mutante vor avea o clonă celulară mutantă, prezentă doar la nivelul unor țesuturi, rezultând un mozaicism somatic; mozaicismul presupune existența a cel puțin două linii celulare diferite din punct de vedere genetic care apar în urma unei erori a mitozei).

În funcție de modul de producere mutațiile pot fi *spontane* [sunt produse natural, deseori sunt generate de erori de replicare, rata fiind de 10^{-10} mutații/diviziune celulară, dar pot apărea și în absența replicării sau pot fi produse de radioactivitatea naturală (reprezentată de razele cosmice, radioactivitatea terestră permanentă și iradierea internă)] sau *induse* [produse de agenți genotoxici externi (exogeni) care acționează asupra materialului genetic și anume: radiații ionizante, ultraviolete UV, substanțe chimice, substanțe cancerigene sau produse de agenți mutageni endogeni (interni) cum ar fi speciile reactive de oxigen]. Agenții mutageni sunt factori externi, fizici sau chimici, capabili să producă o mutație, de obicei la nivelul ADN-ului, crescând astfel frecvența de apariție a acestora.

În funcție de genomul interesat mutațiile pot fi *nucleare* (când sunt localizate la nivelul ADN-ului nuclear) și *mitochondriale* (când este interesat genomul mitocondrial, ADNmt).

În raport cu gradul de afectare al materialului genetic, de unitatea genetică interesată, pot fi identificate mai multe categorii de mutații:

- *mutații genomiale* (sau „de ploidie”). Acestea afectează cantitatea de material genetic și sunt reprezentate de modificarea numărului diploid ($2n$) de cromozomi: *aneuploidii* (interesează 1-2 perechi de cromozomi, de exemplu: trisomii $2n+1$, polisomii, de exemplu: $2n+2$, $2n+3$, monosomii $2n-1$) sau *poliploidii* (interesează

toți cromozomii prin adăugarea unor seturi haploide de cromozomi în celulele somatice, mai frecvent 1 sau 2 seturi haploide). Mutațiile genomiale sunt cele mai frecvente mutații la om.

- *mutații cromozomiale*, sunt determinate de modificări în structura cromozomilor (anomalii cromozomiale produse de pierderea, câștigul sau rearanjarea unor segmente din cromozom, de exemplu deleții, duplicații, inversii, inserții, translocatii (*inversii* – modificarea poziției unui segment cromozomial prin rotirea cu 180° a unui fragment situat între două puncte de ruptură, urmat de reunirea fragmentelor fără afectarea cantității totale de material genetic; *inserții* – transferul unui segment cromozomial de pe un cromozom pe un alt cromozom neomolog; *translocatii* – modificarea poziției unor fragmente cromozomiale prin transferul acestora între doi sau mai mulți cromozomi);
- *mutații genice*, determinate de modificarea în secvența nucleotidică a unei gene; ele pot interesa fie o pereche sau câteva perechi de nucleotide, din gena normală („de tip sălbatic” sau “wild-type”), formând o variantă alelică, fie interesează întreaga genă sau o parte a acesteia.

Există modificări simple sau complexe, microleziuni (interesează unul sau mai multe nucleotide) sau macroleziuni [interesează gena în întregime sau o parte din genă, de exemplu deleții sau duplicații mari, inversii, fuziuni de gene, de exemplu gena de fuziune *PML-RARA* între gena pentru receptorul alfa al acidului retinoic și *PML* în leucemia acută promielocitară (LAM-M3), apărută în urma translocatiei $t(15;17)(q22;q21)$].

Deoarece în capitolul următor se va discuta despre tehnicile de diagnostic molecular, în continuare vor fi abordate mutațiile genice.

24.3 MUTAȚIILE GENICE

Mutațiile genice apar cu o anumită frecvență (numită “rată de mutație”) care variază în funcție de: *mărimea genei* (genele mari au o rată mai mare de mutații, de exemplu gena pentru distrofină are 79 de exoni, este cea mai mare genă identificată la om și se caracterizează printr-o rată crescută de mutații); de *prezența unor “puncte fierbinți”* în interiorul genei (de exemplu existența unor insule de tip CpG în gena *FGFR3*, s-a dovedit că mutația la acest nivel este de peste 100 de ori mai frecventă decât alte mutații la pacienții cu acondroplazie); *mutațiile noi* (mutație “de novo”, se produc de obicei în gametogeneză, cu ocazia diviziunilor meiotice ale celulelor germinale).

Trebuie reținut faptul că 1-2% din persoane au un efect determinat de mutația unei gene; fiecare individ este heterozigot, purtător de aproximativ 6 până la 10 gene recesive și că fiecare persoană este heterozigotă (purtătoare, heterozigot – locii omologi sunt ocupați de variante alelice diferite) pentru aproximativ 3-5 gene letale, recesive (în cazul în care acestea se vor găsi în stare homozigotă la descendenți vor determina moartea lor, homozigot – locii omologi sunt ocupați de alele identice).

O altă clasificare a mutațiilor se poate face ținând cont de modificarea produsă în secvența de nucleotide a ADN-ului, situație în care se pot deosebi:

toți cromozomii prin adăugarea unor seturi haploide de cromozomi în celulele somatice, mai frecvent 1 sau 2 seturi haploide). Mutațiile genomiale sunt cele mai frecvente mutații la om.

- *mutații cromozomiale*, sunt determinate de modificări în structura cromozomilor (anomalii cromozomiale produse de pierderea, câștigul sau rearanjarea unor segmente din cromozom, de exemplu deleții, duplicații, inversii, inserții, translocatii (*inversii* – modificarea poziției unui segment cromozomial prin rotirea cu 180° a unui fragment situat între două puncte de ruptură, urmat de reunirea fragmentelor fără afectarea cantității totale de material genetic; *inserții* – transferul unui segment cromozomial de pe un cromozom pe un alt cromozom neomolog; *translocatii* – modificarea poziției unor fragmente cromozomiale prin transferul acestora între doi sau mai mulți cromozomi);
- *mutații genice*, determinate de modificarea în secvența nucleotidică a unei gene; ele pot interesa fie o pereche sau câteva perechi de nucleotide, din gena normală („de tip sălbatic” sau “wild-type”), formând o variantă alelică, fie interesează întreaga genă sau o parte a acesteia.

Există modificări simple sau complexe, microleziuni (interesează unul sau mai multe nucleotide) sau macroleziuni [interesează gena în întregime sau o parte din genă, de exemplu deleții sau duplicații mari, inversii, fuziuni de gene, de exemplu gena de fuziune *PML-RARA* între gena pentru receptorul alfa al acidului retinoic și *PML* în leucemia acută promielocitară (LAM-M3), apărută în urma translocatiei $t(15;17)(q22;q21)$].

Deoarece în capitolul următor se va discuta despre tehnicile de diagnostic molecular, în continuare vor fi abordate mutațiile genice.

24.3 MUTAȚIILE GENICE

Mutațiile genice apar cu o anumită frecvență (numită “rată de mutație”) care variază în funcție de: *mărimea genei* (genele mari au o rată mai mare de mutații, de exemplu gena pentru distrofină are 79 de exoni, este cea mai mare genă identificată la om și se caracterizează printr-o rată crescută de mutații); de *prezența unor “puncte fierbinți”* în interiorul genei (de exemplu existența unor insule de tip CpG în gena *FGFR3*, s-a dovedit că mutația la acest nivel este de peste 100 de ori mai frecventă decât alte mutații la pacienții cu acondroplazie); *mutațiile noi* (mutație “de novo”, se produc de obicei în gametogeneză, cu ocazia diviziunilor meiotice ale celulelor germinale).

Trebuie reținut faptul că 1-2% din persoane au un efect determinat de mutația unei gene; fiecare individ este heterozigot, purtător de aproximativ 6 până la 10 gene recesive și că fiecare persoană este heterozigotă (purtătoare, heterozigot – locii omologi sunt ocupați de variante alelice diferite) pentru aproximativ 3-5 gene letale, recesive (în cazul în care acestea se vor găsi în stare homozigotă la descendenți vor determina moartea lor, homozigot – locii omologi sunt ocupați de alele identice).

O altă clasificare a mutațiilor se poate face ținând cont de modificarea produsă în secvența de nucleotide a ADN-ului, situație în care se pot deosebi:

- substituții nucleotidice – de obicei implică înlocuirea unei singure perechi de baze; rareori substituția poate interesa mai multe nucleotide grupate; substituția poate apărea intragenic sau mai frecvent extragenic (polimorfisme mononucleotidice);
- deleții – implică pierderea unuia sau mai multor nucleotide de la nivelul genei, rareori segmente din genă (exoni) sau gena în întregime;
- inserții – presupune adăugarea unuia sau mai multor nucleotide în structura genei; rar se pot produce inserții largi, a unor secvențe mari (acestea apar prin transpoziție), amplificarea unor repetări trinucleotidice sau chiar duplicația genei.

Una dintre cele mai frecvente mutații întâlnite la om este substituția unui singur nucleotid (respectiv a unei perechi de baze în ADN dublu catenar, ADNdc), numită *mutație punctiformă*. Substituțiile pot fi de două tipuri: *tranziții* (adică are loc înlocuirea unei baze purinice sau pirimidinice cu o bază de același tip, adică se menține tipul bazei azotate ($A \leftrightarrow G$; $T \leftrightarrow C$) și *transversii* (în care o bază azotată pirimidinică este substituită de o bază purinică și vice versa ($T \leftrightarrow A$; $C \leftrightarrow A$; $T \leftrightarrow G$; $G \leftrightarrow C$)). În genomul uman multe dintre substituțiile unui singur nucleotid (30%) interesează dinucleotidul CpG (sau 5'-CG-3').

Efectele substituției unui nucleotid asupra informației genetice depind de localizarea intragenică a mutației [în *secvențele codante* situație frecvent întâlnită în marea majoritate a mutațiilor patogene; în *secvențele necodante* apar mai ales la nivelul intronilor; în *secvențele reglatoare* determinând modificarea ratei de transcripție sau afectând stabilitatea ARN mesager (ARNm) format]. Deși mutațiile punctiforme pot fi considerate ca modificări de dimensiuni mici, consecințele acestora pot fi uneori severe (de exemplu anemia falciformă sau drepanocitoza sau sicklemia, aceasta se manifestă la homozigoți printr-o anemie hemolitică severă).

În cazul în care substituția este localizată la nivelul exonilor, adică a regiunilor codante aceasta poate interesa un codon sens sau nonsens și modifică codonul respectiv, putând astfel să-i schimbe semnificația acestuia și să ducă la încorporarea unui aminoacid diferit. Substituția într-un codon sens poate duce la apariția unui *codon sens sinonim* (acesta semnifică același aminoacid; mutația fiind fără efect asupra funcției proteinei, este numită *mutație silențioasă* sau *mutație sinonimă*) (vezi figura 24.1); unui *alt codon sens* (acest codon are alt sens, respectiv specifică un aminoacid diferit; acest tip de mutație este numită *mutație nesinonimă* sau *mutație cu sens greșit*, mutația nesinonimă poate afecta stabilitatea proteinei, localizarea intracelulară a acesteia) (vezi figura 24.2) sau poate apărea un *codon non-sens* sau *stop* (acesta nu semnifică nici un aminoacid; duc la oprirea prematură a translației având ca rezultat apariția un ARNm mai scurt respectiv a unei proteinei „trunchiate”, acest tip de mutație este numită *mutație non-sens*, situație întâlnită în hemoglobinopatii, în neurofibromatoză) (vezi figura 24.3).

Substituția într-un codon non-sens (codon stop) poate duce la apariția unui codon sens care specifică un aminoacid (în acest caz codonul stop este anulat astfel transcripția va continua până la apariția următorului codon stop având ca rezultat apariția unui ARN mesager mai lung, lanțul polipeptidic fiind anormal de lung, un asemenea mecanism fiind întâlnit în

GCC	ATA	AGC	TAC	TTC	ADN (Normal)
		↓			
GCC	AUA	AGC	UAC	UUC	ARNm
		↓			
Ala	Ile	Ser	Tyr	Phe	
GCC	ATA	AGT	TAC	TTC	ADN
		↓			
GCC	AUA	AGC	UAC	UUC	ARNm
		↓			
Ala	Ile	Ser	Tyr	Phe	

Figura 24.1 Mutație sinonimă (silențioasă)

GCC	ATA	AGC	TAC	TTC	ADN (Normal)
		↓			
GCC	AUA	AGC	UAC	UUC	ARNm
		↓			
Ala	Ile	Ser	Tyr	Phe	
GCC	ATA	AAC	TAC	TTC	ADN
		↓			
GCC	AUA	AAC	UAC	UUC	ARNm
		↓			
Ala	Ile	Asn	Tyr	Phe	

Figura 24.2 Mutație cu sens greșit

GCC	ATA	AGC	TAC	TTC	ADN (Normal)
		↓			
GCC	AUA	AGC	UAC	UUC	ARNm
		↓			
Ala	Ile	Ser	Tyr	Phe	
GCC	ATA	AGC	TAA	TTC	ADN
			↓		
GCC	AUA	AGC	UAA	UUC	ARNm
			↓		
Ala	Ile	Ser	Codon stop		

Figura 24.3 Mutație non-sens

hemoglobinopatii) sau a unui alt codon stop (situație în care mutația este fără efect asupra proteinei).

Mutațiile pot fi și consecința unor deleții sau inserții care interesează una sau mai multe nucleotide; acestea pot fi localizate atât extragenic (microsateliți, minisateliți) cât și intragenic, și reprezintă aproximativ 25% din mutațiile responsabile de producerea afecțiunilor genetice întâlnite la om.

În cazul în care delețiile sau inserțiile cuprind un număr de nucleotide multiplu de trei, se produce absența sau adăugarea unor aminoacizi în proteină. De exemplu, în fibroza chistică (boală monogenică recesiv autozomală) cea mai frecventă mutație în populația europeană este reprezentată prin deleția (del) a trei perechi de nucleotide din gena CF („cystic fibrosis”) având ca rezultat pierderea fenilalaninei (Phe sau F) din poziția 508 a proteinei reglatoare transmembranare CFTR (mutația F508del) (vezi figura 24.4).

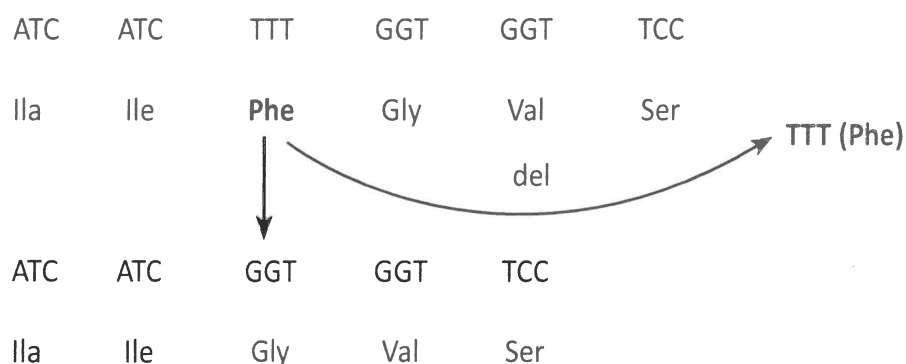


Figura 24.4 Deleția a trei perechi de nucleotide din gena CFTR (cu pierderea Phe din poziția 508), mutația F508del (F=fenilalanină)

În cazul în care numărul nucleotidelor interesate (prin deleție sau inserție) nu este un multiplu de trei (adică nu interesează totalitatea bazelor din codonii implicați în mutație) are loc o decalare a cadrului de lectură al genei, de la locul în care s-a produs deleția sau inserția („frame-shift mutations”) (vezi figura 24.5), schimbându-se complet secvența aminoacidică a

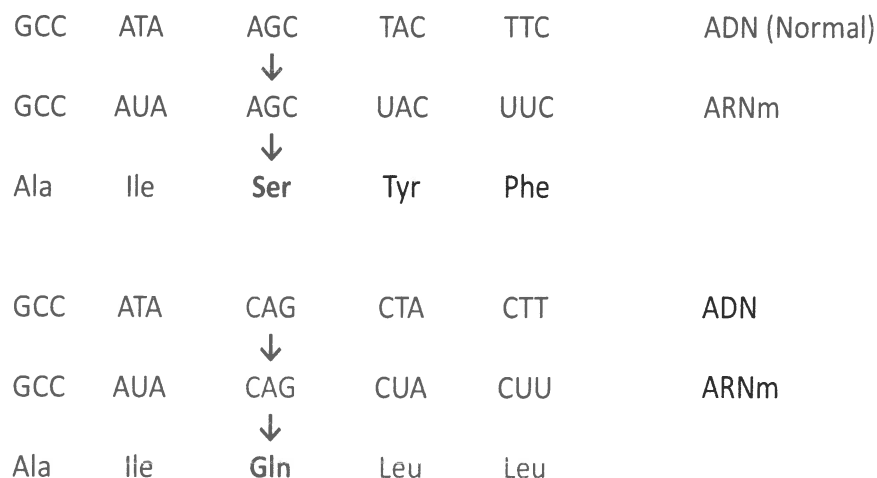


Figura 24.5 Mutație prin inserția unui nucleotid, având ca rezultat decalarea cadrului de lectură

proteinei în aval de locul mutației. Deseori aceste mutații determină apariția unui codon stop în aval de locul deleției sau al inserției, ordinea procesului de translație fiind complet decalată de la locul mutației, rezultatul fiind o proteină modificată, și anume o proteină trunchiată.

Mutațiile pot interesa o parte din genă sau chiar întreaga genă, fiind cunoscute ca mutații extinse (deleții sau inserții de dimensiuni mari, duplicații și inversii). Mutațiile extinse sunt remanieri genice aberante și apar prin schimburi între secvențe de ADN alelice sau nealelice. Mutațiile extinse antrenează alterări grave ale funcției genice acestea stând la baza unor boli genetice. Mutațiile extinse sunt frecvent întâlnite în anumite boli (în 60% din cazurile de distrofie musculară Duchenne DMD, și în amiotrofiile spinale AMS, situație în care 94% din cazuri apar în urma deleției genei SMN1).

Mutațiile extinse apar prin: *recombinarea omoloagă nealelică* (RON) între secvențe identice sau cvasi-identice cu amplasare diferită; *recombinare neomoloagă* (nelegitimă) nealelică, apărută între secvențe care nu prezintă omologie sau prin recombinare genică prin mecanism replicativ (implicate de exemplu în apariția CNV – copy number variation).

În cazul în care mutația este localizată în *secvența reglatoare*, aceasta va modifica rata de transcripție, precum și translația. Majoritatea mutațiilor localizate la nivelul acestor secvențe interesează mai ales promotorul. Astfel mutațiile la nivelul promotorului pot diminua afinitatea ARN polimerazei pentru un anumit situs având ca rezultat scăderea producerii de ARNm, diminuând astfel cantitatea de proteină.

Mutațiile pot interfera cu procesul de matisare (de decupare și eliminare precisă a ARN intronic urmată de “unirea” cap la cap a exonilor). Matisarea este dependentă de existența unor situsuri de matisare la granița exoni-introni, reprezentate de situsul donor (5'-GT) sau acceptor (AG-3'). Astfel mutațiile pot crea situsuri noi de matisare ceea ce va determina eliminarea unei părți a exonului din ARN mesager. Mutațiile (reprezentate de substituții) la nivelul situsurilor de decupare a intronilor (“splice site mutations”) fac ca excizia să se producă la următorul exon și, ca atare, în ARNm matur va fi inclus întregul intron sau o parte a acestuia sau va lipsi un exon (“exon skipping”), în funcție de situsul afectat. Astfel, expresia genei este perturbată datorită formării unui ARNm instabil (iar în final, un polipeptid nefuncțional).

După cum este bine cunoscut, mutațiile au fost considerate inițial ca modificări permanente și ereditare în secvența nucleotidică a ADN, acestea având ca rezultat apariția de variante alelice ale secvenței de ADN. S-au descris (în 1991) o clasă nouă de mutații, denumite *mutații dinamice sau instabile*. Acestea interesează microsateliții (STR, short tandem repeats, repetiții foarte scurte, 1-15pb, frecvent dinucleotidice sau trinucleotidice, distribuite uniform în genom). Variația numărului de copii de la nivelul microsateliților se realizează prin fenomenul de glisare sau derapare replicativă, determinat de alinierea greșită și împerecherea decalată a secvențelor repetate. Astfel glisarea înapoi va determina inserții ale secvențelor repetate, iar glisarea înainte va duce la deleții la nivelul repetițiilor.

Mutațiile dinamice se caracterizează prin instabilitate (exprimată prin creșterea numărului unor repetiții trinucleotidice în cursul meiozei, de obicei a ovogenezei, rareori în mitoza, situație în care duc la apariția de mozaicisme). Instabilitatea se manifestă clinic (apariția unei

boli) doar când este depășit un anumit prag critic de repetiții (vezi tabelul 24.I). Numărul de repetiții trinucleotidice (de la nivelul unui anumit locus) prezintă variații în populație, sub pragul critic acestea generând polimorfisme ADN benigne, adică gena funcționează normal, respectiv expansiunea este stabilă, fără modificări fenotipice. O nouă traversare a meiozei (în gonadele bolnavilor), poate duce la expansiuni adiționale (*premutație*), astfel secvența de ADN devine instabilă, dar nu determină un fenotip patologic. Purtătorii premutațiilor sunt fenotipic normali, dar dacă sunt transmise în generația următoare vor determina creșterea numărului de repetiții având ca rezultat apariția unei mutații complete (care va determina boala). O altă caracteristică a mutațiilor dinamice o reprezintă *anticipația* (apariția unei boli mai severe, cu manifestare mai precoce, la o vârstă mai mică). Severitatea bolii la descendenți este proporțională cu numărul de repetiții. S-a observat un efect parental al mutațiilor dinamice, adică severitatea manifestărilor clinice la descendenți depinde uneori de sexul părintelui prin care se face transmiterea. De exemplu, în sindromul X fragil dacă transmiterea se face de către mamă manifestările clinice sunt mai severe, iar în coreea Huntington simptomatologia este mai gravă în cazul în care aceasta este transmisă de către tată. Bolile produse de mutații dinamice sunt clasificate în două categorii: boli poli Q sau "boli poliglutaminice", prin repetiții CAG (inclusiv 9 boli neurologice, neuromusculare) și boli non-poli Q (prin repetiții CGG, GAA, CTG, CCG).

Mutațiile în ADN-ul mitocondrial. Majoritatea mutațiilor interesează ADN-ul nuclear (genomul nuclear reprezentând majoritatea genomului, 98%, comparativ cu genomul mitocondrial care reprezintă aproximativ 2% din întregul genom). Trebuie reținut faptul că

Tabel 24.I Boli prin repetiții trinucleotidice

Boala	OMIM	Trinucleotide	Numărul normal de repetiții	Numărul de repetiții în cadrul bolii	Manifestări clinice
Sindromul X fragil	309550	CGG sau CCG	6-50	>200	Retard mental, facies lung, macroorhidie
Ataxia Friedreich	229300	GAA	6-29	>100	Probleme de coordonare sau de vorbire, deformări ale coloanei vertebrale, tremor al mâinilor și picioarelor
Boala Huntington	143100	CAG	6-28	>38	Demență, tulburări comportamentale, coree,
Distrofia miotonică tip I	160900	CTG	5-37	>50	distrofie musculară progresivă, slăbiciune musculară, afectare cardiacă, endocrină și a sistemului nervos
Distrofia miotonică tip II	602668	CCTG	<10	>100	distrofie musculară progresivă, slăbiciune musculară, afectare cardiacă, endocrină și a sistemului nervos

OMIM = Online Mendelian Inheritance in Man

genomul mitocondrial prezintă mutații genice care au o serie de particularități diferite față de cele observate în genomul nuclear. Astfel, rata mutațiilor mitocondriale este mult mai mare (de aproximativ 10 – 20 de ori) decât cea a mutațiilor nucleare (datorită procentului foarte mare al regiunilor codante din ADN-ul mitocondrial ADNmt și a lipsei mecanismelor de reparare). Rata crescută a mutațiilor la nivelul ADNmt este favorizată de instabilitatea acestuia. Instabilitatea la nivelul ADNmt este datorată faptului că acesta nu este asociat cu histone. În cazul mutațiilor în ADNmt transmiterea mutațiilor se face pe linie maternă, adică de la mama afectată la toți copii ei, indiferent de sexul acestora (deoarece în cursul fecundării, întreaga citoplasmă a zigotului provine din ovul și astfel întregul genom mitocondrial al fiecărei persoane provine de la mamă). Deoarece într-o celulă există câteva sute de mitocondrii (fiecare conținând 2 – 10 molecule circulare de ADN, format din 16569pb), există o probabilitate mare ca una din acestea să prezinte o mutație. Acumularea mutațiilor în urma stresului oxidativ (în mitocondrii existând un mediu cu un conținut crescut de radicali liberi de oxigen, care au efect mutagen) pot fi implicate în apariția unor boli degenerative, în procesul de îmbătrânire.

Epimutații. Prin epimutații se înțeleg modificările care se produc la nivelul epigenomului.

Epigenomul cuprinde compuși chimici adăugați la nivelul ADN-ului (dar fără să determine schimbări în secvența nucleotidică) ca o modalitate de a regla activitatea (expresia) genelor. Acestea se pot transmite cu ocazia diviziunilor celulare, inclusiv la descendenți. Modificările la nivelul epigenomului pot duce la modificări ale cromatinei și ale funcției genomului. Epigenomul este implicat în reglarea expresiei genice, dezvoltarea, diferențierea țesuturilor, și suprimarea elementelor transpozabile (elemente genetice mobile). Epigenomul poate fi modificat dinamic de condițiile de mediu, acesta fiind foarte sensibil la influența factorilor ambientali (dietă, noxe chimice).

Modificările epigenetice, reprezintă o posibilitate de modificare a funcției genelor fără să implice modificări în secvența nucleotidică. Modificările epigenetice pot fi reprezentate de exemplu de: acetilarea histonelor (permite realizarea transcripției), metilarea histonelor (se asociază cu represarea transcripției).

Metilarea ADN-ului are loc la nivelul citozinei de la nivelul insulelor CpG, dar și în interiorul unor gene, și este implicată în controlul expresiei genice. Metilarea citozinei din ADN reprezintă cel mai important mecanism epigenetic de inactivare genică, de represare a transcripției. Demetilarea, realizată prin acțiunea ADN-demetilazei, favorizează transcripția.

Metilarea este singurul “parametru” genomic flexibil, care poate schimba funcția genomului sub influența unor factori exogeni (chiar și cei alimentari). Prin urmare, constituie principala punte de legătură între genetică, boală și factorii de mediu, și se presupune că are un rol decisiv în etiologia a aproape tuturor bolilor la om.

Modificările epigenetice sunt implicate în dezvoltarea umană, îmbătrânire, dar și în patogenia unor boli precum cancerul, boli cardiovasculare, metabolice.

HEP (Human Epigenome Project) are ca și scop identificarea, clasificarea și interpretarea tuturor modelelor de metilare de la nivelul ADN-ului uman.

24.4 MECANISMELE DE REPARARE A LEZIUNILOR DE LA NIVELUL ADN-ULUI

Deși, la nivelul genomului uman se produc numeroase mutații (spontane sau induse sub acțiunea unor factori exogeni sau endogeni), rata mutațiilor este menținută la un nivel mic datorită intervenției unor sisteme de reparare responsabile de recunoaștere și corectarea leziunilor de la nivelul ADN-ului.

Aceste sisteme realizează fie o reparare parțială, fie o reparare completă cu refacerea structurii inițiale. Aceste sisteme de reparare acționează în paralel cu mecanismele care coordonează progresia prin ciclul celular. Unele leziuni sunt tolerate (datorită saturării mecanismelor de reparare) sau se produce apoptoza (în cazul leziunilor prea grave sau numeroase).

Mutațiile genice, produse prin erori de replicare, sau induse de agenți genotoxici externi sau interni, pot fi grupate în următoarele categorii:

- alterări ale bazelor azotate (dezaminări spontane, metilări, dimeri de timină, adiții, substituții, deleții, crearea de situsuri abazice), apar sub acțiunea radicalilor liberi de O_2 .
- legarea transversală (coalescența bazelor, prin formarea de punți intra- sau intercatenare datorită unor agenți intercalanți, ca de exemplu acridin orange, bromura de etidiu), acestea cauzează inserții care duc la decalarea cadrului de lectură.
- rupturi catenare (monocatenare, respectiv bicatenare).

În figura numărul 24.6 sunt ilustrați principalii agenți care produc modificări la nivelul ADN-ului, leziunile ADN-ului cauzate de acești agenți, precum și mecanismele de reparare a leziunilor ADN-ului.

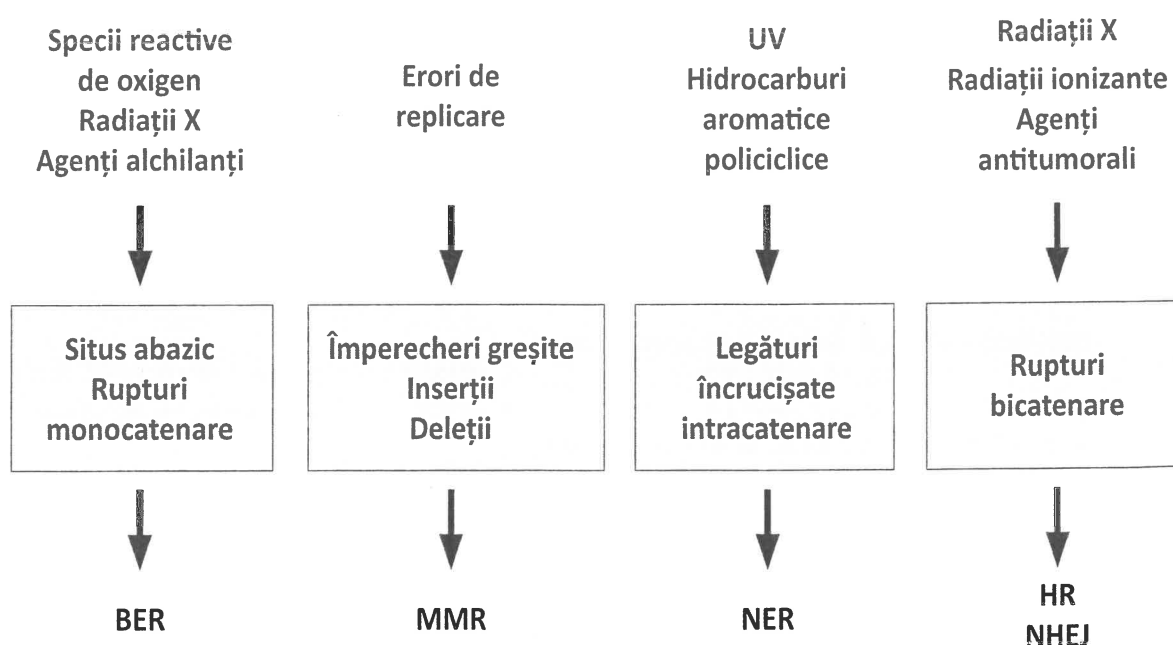


Figura 24.6 Leziunile ADN și mecanismele de reparare ale acestora

Repararea erorilor de împerechere din cursul replicării ADN. În replicare, în momentul în care catenele ADN sunt separate, are loc aranjarea pe bază de complementaritate a nucleotidelor în lungul matriței de ADN. În timpul replicării secvențelor repetitive ale ADN-ului are loc fenomenul de “alunecare (glisare)” a ADNpol (ADN polimeraza), având ca rezultat alungirea (prin inserție) sau scurtarea (prin deleție) secvenței repetitive. Cu toate acestea, rata mutațiilor este mult mai mică prin intervenția unor mecanisme care asigură replicarea cu precizie și transmiterea informației ereditare. Un rol important îl au ADNpol care vor duce la apariția unor “distorsiuni” la nivelul ADN-ului bicatenar în cazul unor împerecheri greșite (ADNpol nu realizează încorporarea pasivă a oricărui nucleotid). Distorsiunile de la nivelul ADNdc vor acționa ca semnal pentru îndepărtarea bazelor inserate greșit.

Acuratețea replicării ADN este asigurată de activitatea de autocorecție a ADN polimerazelor. Acestea sesizează dacă există o eroare de împerechere. În cazul unei astfel de greșeli de împerechere ele pot să excizeze nucleotidul greșit (datorită faptului că ADN polimerazele δ și ϵ au capacitate exonucleazică 3' – 5') și să-l înlocuiască cu nucleotidul corespunzător.

Mecanismele de reparare a erorilor de împerechere (MMR, “mismatch repair”) recunosc perechile de baze care nu respectă legea complementarității, nucleotide inserate adițional (erorile de împerechere) după care are loc secționarea și degradarea exonucleazică a fragmentului ADN care conține baza inserată greșit (cu dimensiuni de > 1-2 kb), urmată de refacerea secvenței normale (vezi figura 24.7).

Mutațiile la nivelul genelor care codifică proteine implicate în mecanismul de reparare a erorilor de împerechere (MMR) se asociază cu un risc crescut de apariție a unor cancere (de exemplu cancerul colorectal non-polipozic ereditar – HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer, caracterizat prin instabilitatea microsateliților, “MSI”). Instabilitatea microsateliților, o formă de instabilitate genetică, este asociată cu o creștere de 100-1000 de ori a ratei mutațiilor și reprezintă un eveniment precoce în dezvoltarea tumorală (fiind întâlnită în cancere de colon, endometru, stomac).

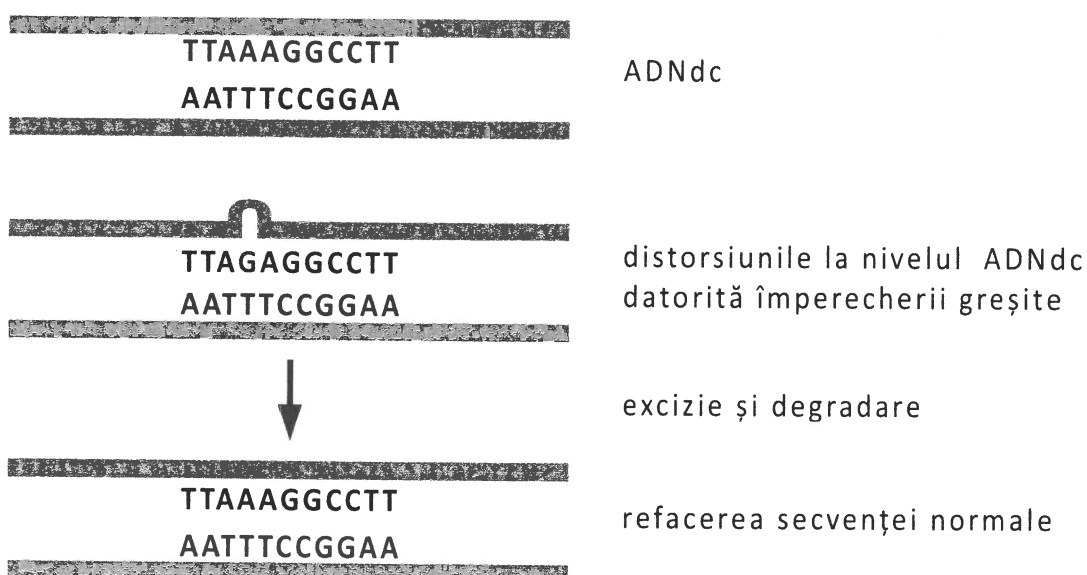


Figura 24.7 Mecanismul de reparare a erorilor de împerechere (MMR)

Principalul mecanism de reparare a mutațiilor ADN la om este reprezentat de *repararea prin excizie și resinteză*. Acesta se realizează după următorul scenariu: recunoașterea leziunii, prin acțiunea unor enzime specifice; desfacerea ADNdc, prin intervenția helicazei; excizia de către endonucleaze a fragmentului de ADN modificat; îndepărtarea și degradarea de către exonucleaze a fragmentului de ADN modificat; resinteza unui fragment nou prin acțiunea unor ADN-polimeraze (catena de ADN complementară servind ca matriță); realizarea legăturii între fragmentul de ADN nou sintetizat și capetele libere ale catenei de ADN, de către ligaze (figura 24.8).

Mecanismul de reparare prin excizie și resinteză poate prezenta mai multe variante: reparare prin excizie de baze (BER), reparare prin excizie de nucleotide (NER), mecanismul de reparare a erorilor de împerechere (MMR).

Repararea bazelor modificate sau alterate după replicare. După replicare se produc frecvent modificări chimice sau alterări ale bazelor azotate. De obicei leziunile la nivelul ADN-ului produse de factorii genotoxici interni sunt corectate prin mecanismul de excizie a bazelor modificate (BER) sau, mai rar, prin reparare directă mono-enzimatică (fără excizie, prin intervenția MGMT, metil-guanin-metil-transferaza). Factorii genotoxici externi produc distorsiuni la nivelul ADNdc prin legături încrucișate intracatenare sau intercatenare; acestea fiind îndepărtate prin excizie de nucleotide (NER).

Mutațiile la nivelul genelor implicate în repararea ADN-ului sunt evenimente cheie în evoluția clonei neoplazice. Funcționarea necorespunzătoare a mecanismelor de reparare

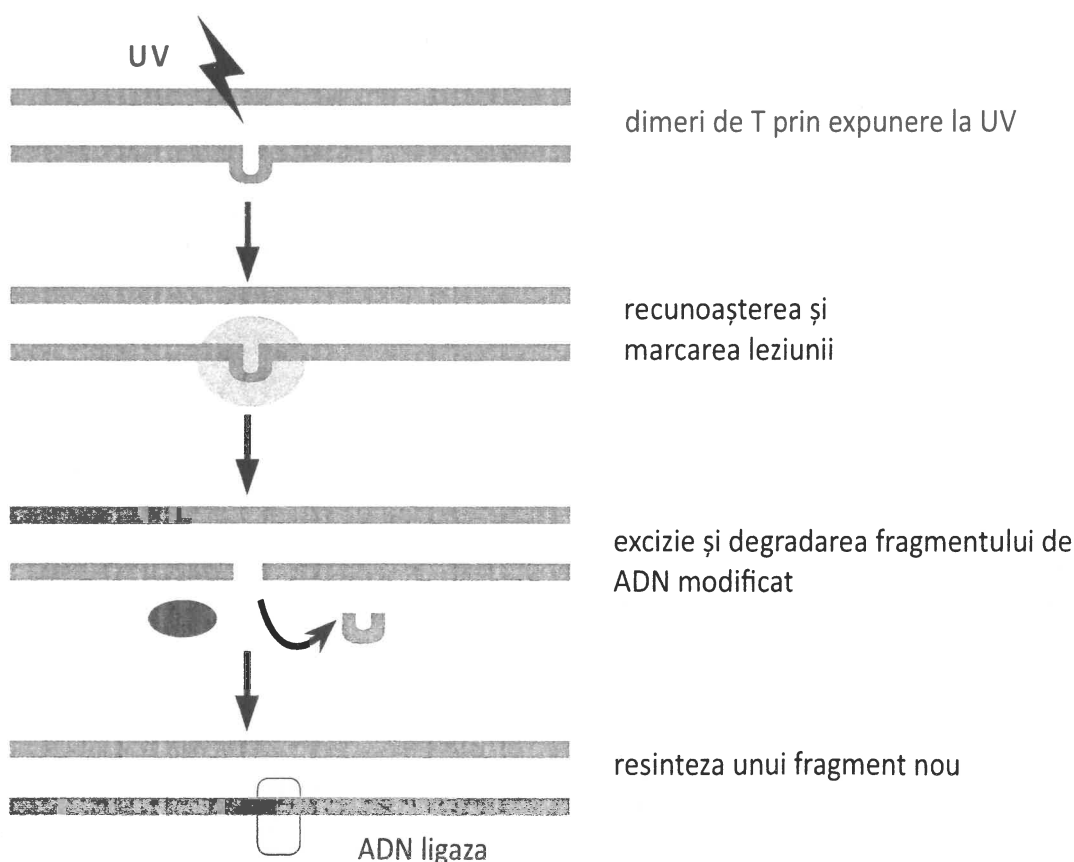


Figura 24.8 Mecanismul de reparare a ADN-ului prin excizie-resinteză

a ADN-ului poate duce la instabilitate genomială, interesând inclusiv genele supresoare tumorale, având ca rezultat transformarea neoplazică.

Repararea prin excizie de baze (BER). Mecanismul de reparare BER este utilizat pentru corectarea diferitelor leziuni ADN. BER permite înlocuirea a 1-5 baze simultan, dar de obicei corectează erorile generate de speciile reactive de oxigen. BER intervine și în repararea rupturilor monocatenare ale ADN, produse de speciile reactive de oxigen. Spre deosebire de NER, nu modifică semnificativ structura ADNdc.

Astfel, în cazul unei dezaminări spontane (5-metilcitozină → timină) se formează o bază modificată care va fi recunoscută și îndepărtată de către glicozilază (care va cliva legătura glicozil dintre riboză și baza azotată) creând un situs abazic. Acesta va fi recunoscut de către o endonuclează (APE1, apurinic endonuclease 1) care va cliva catena de ADN la acest nivel. Rezidul 5'-dezoxiribozo-fosfat va fi îndepărtat și se va insera nucleotidul corespunzător, urmată de refacerea continuității catenei. În funcție de polimeraza folosită și de numărul de nucleotide interesate se pot folosi două căi alternative de reparare. În cazul în care este interesat un singur nucleotid se va alege calea scurtă de reparare ("short-patch BER"), iar în cazul în care este necesară îndepărtarea a 2 – 13 nucleotide este utilizată calea lungă de reparare ("long-patch BER"). Calea scurtă de reparare (short-patch) BER reprezintă aproximativ 80-90% din totalul reparărilor BER. Calea lungă de reparare (long-patch) BER necesită prezența câtorva proteine asociate cu replicarea (ADN polimeraza δ sau ϵ , PCNA (proliferating cell nuclear antigen), RFC (replication factor-C), FEN1 (flap endonuclease-1) și ADN ligaza (tabelul 24.II).

Repararea prin excizie de nucleotide (NER). Acest sistem de reparare este extrem de complex implicând numeroase gene și aproximativ 30 de proteine.

NER permite înlocuirea până la 30 de nucleotide, și este folosit pentru corectarea unor leziuni ADN asociate cu distorsiunea ADNdc (de exemplu dimerii de timină rezultați în urma expunerii la UV) modificările produse de expunerea la agenți cancerigeni, cisplatin.

Tabelul 24.II Gene implicate în mecanismele de reparare a ADN-ului

Mecanism	Gene
BER (reparare prin excizie de baze)	ADN glicozilaza, APE1, XRCC1, ADN polimeraza β , δ sau ϵ , FEN1
NER (reparare prin excizie de nucleotide)	XPC-Rad23, XPE, CSA(ERCC8), CSB (ERCC6), XPB, XPD, XPA, RPA, XPG, ERCC1 (RAD10), XPF, ADN polimeraza δ sau ϵ ,
MMR (mecanismul de reparare a erorilor de împerechere)	MSH2/MSH6 (MutS α), MSH2/MSH3 (MutS β), MLH1/PMS2 (MutL α), MLH1/PMS2 (MutL β), MLH1/MLH3 (MutL γ), Exo1, PCNA-RFC
HR (recombinare omoloagă)	RPA, RAD51(XRCC2), RAD52, BRCA1, BRCA2
NHEJ (unirea neomoloagă a capetelor)	XRCC4, ADN ligaza, XLF, Ku70-Ku80

XRCC1, XRCC3, XRCC4 = X-ray repair cross-complementing protein 1, 3, 4; XPA, XPD, XPE, XPF, XPG = xeroderma pigmentosum group A, D, E, F, G; CS = Cockayne syndrome (CSA, CSB)

NER este un mecanism deosebit de important, deoarece permite corectarea leziunilor de la nivelul ADN-ului induse de lumina ultravioletă (UV).

Importanța biologică a NER este susținută de faptul că mutațiile la nivelul genelor implicate în NER pot provoca mai multe boli genetice, inclusiv Xeroderma pigmentosum, sindromul Cockayne și Trichothiodistrofia, care sunt caracterizate prin fotosensibilitate. În plus, aceste boli se asociază cu: un risc crescut de apariție a neoplaziilor, retard în dezvoltare, deficit imun, neurodegenerare, și îmbătrânirea prematură.

NER poate fi subdivizat într-un sistem de reparare genomică globală, respectiv într-un sistem de reparare cuplat cu transcripția ("transcription-coupled NER repair", TCR-NER).

Sistemul de reparare genomică globală („global genomic NER repair”, GG-NER) este folosit atât în cazul catenelor de ADN transcrise cât și al celor netranscrise, în genele active și inactive de la nivelul genomului. Sistemul de reparare cuplat cu transcripția este folosit pentru repararea leziunilor în genele transcrise (în această situație repararea se face de 5-10 ori mai rapid decât în cazul reparării genomice globale).

Mutațiile la nivelul sistemului de reparare genomică globală sunt responsabile de apariția a numeroase boli, inclusiv Xeroderma pigmentosum. Mutațiile la nivelul sistemului de reparare cuplat cu transcripția sunt asociate cu apariția sindromului Cockayne și a Tricodistrofiei.

Repararea rupturilor monocatenare și bicatenare ale ADN. Rupturile monocatenare sunt produse de radiațiile ionizante sau de speciile reactive de oxigen. Repararea rupturilor monocatenare ale ADN este realizată deseori prin sistemul de reparare BER.

Rupturile bicatenare sunt produse mai frecvent de radiațiile ionizante sau pot fi generate de erori ale replicării sau recombinării (mai rar). Repararea acestora presupune recunoașterea leziunii (ruptura ADN bicatenară), prin intervenția unui sistem BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex). Apoi are loc etapa de semnalizare, care implică kinazele ATM și ATR care vor activa câteva proteine importante pentru repararea propriu-zisă (BRCA1) sau vor bloca ciclul celular (prin intervenția proteinei P53). După parcurgerea acestor etape comune, celula va alege una din căile alternative de reparare: recombinarea omoloagă (homologous recombination, HR) sau mai rar unirea neomoloagă a capetelor (non-homologous end joining, NHEJ).

Recombinarea omoloagă (HR) utilizează ca matriță pentru reparare o catenă de ADN intactă fie de pe cromatida soră sau fie de pe cromozomul omolog. Unirea neomoloagă a capetelor (NHEJ) este un mecanism prin care se realizează unirea fără omologie a capetelor rupte al ADN-ului, existând riscul de apariție a unor erori (deleții, inserții).

Mutațiile la nivelul sistemului de reparare a rupturilor bicatenare sunt responsabile de apariția a numeroase boli: sindromul Bloom, anemia Fanconi, cancerul de sân ereditar, Ataxia teleangiectazia.

Semnificația biologică a mecanismelor de reparare a ADN-ului este subliniată de faptul că perturbarea acestora poate contribui la inițierea și progresia cancerului. Pe de altă parte, repararea ADN-ului poate conferi rezistență la terapia de primă linie în cancere (de exemplu, chimioterapie și radioterapie), care au la bază generarea de leziuni la nivelul ADN-ului

pentru a elimina astfel celulele canceroase. Astfel, sensibilitatea celulelor canceroase la agenți care produc leziuni ADN este probabil legată de existența unor deficiențe la nivelul mecanismelor de repararea a ADN-ului. Capacitatea celulelor canceroase de a recunoaște leziunile ADN-ului și de a iniția repararea ADN-ului este un mecanism cheie pentru rezistența la terapie sau recădere.

24.5 POLIMORFISMELE GENETICE

Descrierea genomului uman a permis identificarea unor variații la nivelul acestuia. Totalitatea variațiilor din genomul uman, adică a modificărilor genetice (identificate la specii, populații cu o schimbare evolutivă relativ mică), poartă denumirea de “variom”.

Identificarea acestor variații, a interacțiunilor cu factorii de mediu vor reprezenta baza medicinei personalizate, a medicinei preventive, acestea reprezentând și scopul unor proiecte internaționale (HapMap Project, Human Variom Project).

Aceste variații din structura genomului sunt clasificate în funcție de mărimea segmentului de ADN interesat în: *variații de secvență* (este interesat un singur nucleotid) și *variante structurale* (includ variații ale fragmentelor de ADN care interesează >1 nucleotid).

Variațiile de secvență sunt reprezentate de **polimorfismele mononucleotidice (SNP, Single Nucleotide Polymorphism)**. SNP reprezintă cea mai simplă și totodată, cea mai frecventă formă de polimorfisme ADN. În prezent s-au identificat aproximativ 18.000.000 de polimorfisme mononucleotidice (SNPs).

Majoritatea polimorfismelor mononucleotidice sunt situate în regiunile intergenice sau la nivelul intronilor. Polimorfismele mononucleotidice de la nivelul regiunilor codante ale genelor pot avea efect fenotipic.

SNP pot fi puse în evidență prin diferite metode (tehnica PCR-RFLP, polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție, secvențiere, tehnica microrețelilor, etc).

Polimorfismele mononucleotidice au fost puse în evidență cu ajutorul enzimelor de restricție (ER) care recunosc o secvență nucleotidică specifică (numită situs de restricție, SR) și secționează ADN-ul la nivelul respectiv, generând fragmente (FR) de o anumită lungime. Polimorfismele mononucleotidice pot aboli un SR sau pot genera unul nou. Astfel după digestia cu enzime de restricție se produc fragmente de restricție (FR) cu lungimi diferite (polimorfism al lungimii fragmentelor de restricție, RFLP).

Variantele structurale cuprind: variații ale fragmentelor cuprinse între 2-1000 nucleotide; variații submicroscopice, acestea includ fragmente de 1000 nucleotide - câteva megabaze (CNV) și variații microscopice.

Variații (polimorfisme) ale fragmentelor cuprinse între 2-1000 nucleotide includ:

- polimorfismele repetițiilor de secvențe scurte (SSR) sau repetiții în tandem în număr variabil (VNTR), sunt reprezentate de *microsateliți* (short tandem repeats, STR, formați din repetiții foarte scurte de 1-15 nucleotide, mai frecvent dinucleotide) și *minisateliți* (repetiții în număr variabil a unor secvențe scurte de 15-500pb). Aceștia reprezintă niște marker genetici individuali deoarece realizează un profil genetic caracteristic (“amprenta ADN”),

- inserțiile și delețiile (indels), interesează fragmente scurte.

Variații (polimorfisme) submicroscopice includ variația numărului de copii (CNV), anomalii cromozomiale submicroscopice de tipul inversiilor și al translocațiilor.

Variația numărului de copii (CNV, copy number variants) reprezintă un segment de ADN ≥ 1 kb care este prezent într-un număr variabil de copii. Variația numărului de copii apare în urma unor erori de replicare sau de recombinare (omoloagă sau ne-omoloagă). Unele dintre acestea se pot asocia cu anumite boli (autism, psoriazis, schizofrenie, obezitate, boala Crohn, diabet, cancer, afecțiuni cardiace) datorită faptului că pot produce modificări ale dozajului genic (prin câștig al numărului de copii – duplicații sau inserții sau prin pierderi al numărului de copii – deleții), pot modifica structura unei gene, intervenind de asemenea și în asigurarea diversității fenotipice.

În cazul în care variațiile numărului de copii (CNV) se întâlnesc la $>1\%$ din populație se discută despre polimorfismul numărului de copii (CNP).

CNV sunt considerate variații de dimensiuni mari ale genomului uman ("variom"). Se estimează că aproximativ 0,4-0,78% din genomul uman la persoane neînrudite diferă în ceea ce privește numărul de copii.

Acestea pot fi puse în evidență prin diferite metode: hibridizare genomică comparativă – CGH, hibridizare genomică comparativă pe microrețele – array CGH (aCGH), cariotipare virtuală cu analiza SNP-urilor (polimorfisme mononucleotidice). Se presupune că există peste 38000 de CNV-uri (reprezentând 7,6% din genom), acestea reprezentând o sursă importantă de variabilitate a genomului uman.

Aproximativ 24% din toate CNV-urilor sunt asociate cu duplicații segmentare sugerând faptul că recombinarea omoloagă nealelică a fost implicată frecvent în geneza acestor CNV-uri.

Polimorfismele ADN sunt utilizate în practica medicală pentru diagnosticul prenatal rapid al aneuploidiilor, pentru identificarea persoanelor cu risc crescut pentru anumite boli, în medicina legală (pentru stabilirea paternității, pentru identificarea persoanelor), în farmacogenomică/medicina personalizată (individualizarea tratamentului fiecărui pacient).

Bibliografie selectivă

1. Bănescu C, Duicu C, Dobreanu M. The Association of the DNA Repair Genes with Acute Myeloid Leukemia: The Susceptibility and the Outcome After Therapy in Myeloid Leukemia - Basic Mechanisms of Leukemogenesis, Ed. Koschmieder, ISBN: 978-953-307-789-5, InTech, 2011, DOI: 10.5772/26145. Available from: <http://www.intechopen.com/books/myeloid-leukemia-basic-mechanisms-of-leukemogenesis/the-association-of-the-dna-repair-genes-with-acute-myeloid-leukemia-the-susceptibility-and-the-outco>
2. Belickova M, Dostalova Merkerova M, Stara E, Vesela J, Sponerova D, Mikulenkov D, Brdicka R, Neuwirtova R, Jonasova A, Cermak J. DNA repair gene variants are associated with an increased risk of myelodysplastic syndromes in a Czech population. *Journal of Hematology & Oncology* 2013, 6:9 doi:10.1186/1756-8722-6-9.

3. Boulton J, Fidler C. *Molecular Analysis of Cancer (Methods in Molecular Medicine)*, Humana Press; 2002 edition. 295-352.
4. Bunz F. *Principles of Cancer Genetics*. Springer; 2008, 1-18, 77-93, 125-130, 227-258.
5. Covic M. Bolile genomice – un domeniu nou și important al patologiei umane, Ed. *Viața medicală românească*. 2012, 21(1167).
6. Dexeux TS. DNA Repair Pathways and Mechanisms. Editors Mathews LA, Cabarcas SM, Hurt EM. *DNA Repair of Cancer Stem Cells*. Springer Science 2013, 19-32.
7. Girirajan S, Campbell CD, Eichler EE. Human copy number variation and complex genetic disease. *Annu Rev Genet*. 2011; 45:203-26.
8. Henrichsen CN, Chagnat E, Reymond A. Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum Mol Genet*. 2009 Apr 15;18(R1):R1-8. doi: 10.1093/hmg/ddp011.
9. Hodgson S, Foulkes W, Eng C, Maher E. *A Practical Guide to Human Cancer Genetics*. Third edition, Cambridge University Press, 2007, 120-130.
10. Iskow RC, Gokcumen O, Lee C. Exploring the role of copy number variants in human adaptation. *Trends Genet*, 2012, 28(6), 245–257. doi:10.1016/j.tig.2012.03.002
11. Kamdar RP, Matsumoto Y. DNA Double-Strand Break Repair Through Non-Homologous End-Joining: Recruitment and Assembly of the Players, Kruman I (Ed.), *DNA Repair*. InTech, 2011, ISBN: 978-953-307-697-3, DOI: 10.5772/21262. Available from: <http://www.intechopen.com/books/dna-repair/dna-double-strand-break-repair-through-non-homologous-end-joining-recruitment-and-assembly-of-the-pl>
12. Kelley RM. *DNA Repair in Cancer Therapy. Molecular Targets and Clinical Applications*. Academic Press; 2011, 295-339.
13. Lewis R. *Human genetics: concepts and applications*. 9th edition. McGraw-Hill New-York, 2010, 214-240.
14. Mkrtchyan H, Gross M, Hinreiner S, Polytko A, Manvelyan M, Mrasek K, et al. doi:10.2174/138920210793176047 The Human Genome Puzzle – the Role of Copy Number Variation in Somatic Mosaicism. *Curr Genomics*. Sep 2010; 11(6): 426–431.
15. Naeim F, Nagesh Rao P, Grody WW. *Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches Hardcover – Academic Press*, 2008.
16. Passarge E. *Color atlas of Genetics*. Ed Thieme Verlag, 2007, 80-94.
17. Popovici C, Covic M, Gorduz V, Sandovici I, Puiu M. Variabilitatea genetică. Covic M, Ștefănescu DT, Sandovici I. *Genetică medicală, ediția a II-a*, Editura Polirom, 2011, 241-266, 287-294.
18. Popp R, Trifa AP. Metode de analiză moleculară a genelor- analiza mutațiilor genice. Secvențierea ADN, Alte tehnici de diagnostic molecular – Mutații genice. sub red Pop IV. *Genetică medicală. Îndrumător de lucrări practice facultatea de medicină*, Ed. Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, 2012, 63-66.
19. Radu M, Mihalache C, Mihalache C. Mecanisme etiopatogenetice ale carcinogenezei. *Acta Medica Transilvanica*, 2014, 1(2):29-31.
20. Schulz W. *Molecular Biology of Human Cancers: An Advanced Student's Textbook*. Springer; 2007 edition. 47-112.
21. Shastri BS. SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype, Komar AA. *Single Nucleotide Polymorphisms. Methods and Protocols 578*, Humana Press, 2009, 3-22.

25

Anomalii genetice în cancer. Analize genetice în cancer

Claudia Bănescu

25.1 INTRODUCERE

Cancerul este o boală complexă care apare ca urmare a unei acumulări progresive de modificări genetice și epigenetice având ca rezultat apariția unei clone celulare care scapă mecanismelor de control al creșterii și proliferării celulare.

În celulele neoplazice pot apărea numeroase anomalii genetice dobândite, inclusiv anomalii cromozomiale numerice sau structurale, amplificări genice, deleții, rearanjări genice, mutații cu pierderea funcției sau mutații cu câștig de funcție.

Cancerul este o boală genetică caracterizată prin modificări la nivelul ADN-ului (fie la nivel nucleotidic, fie la nivel cromozomial). La nivel cromozomial, aceste mutații pot produce: modificarea numărului de cromozomi, pierderea heterozigozității (LOH, pierderea unui cromozom întreg sau doar a unui fragment cromozomial), anomalii cromozomiale structurale (inversii, translocatii, etc.), duplicații sau amplificări genice. Multe dintre aceste aberații citogenetice vizibile microscopic sau criptice (submicroscopice) sunt caracteristice unei boli sau unui subtip de cancer. Deoarece anomaliile cromozomiale caracteristice, furnizează informații cu valoare diagnostică, prognostică, și permit monitorizarea răspunsului la tratament pentru multe tipuri de cancer (în special în afecțiunile maligne hematologice), acestea pot fi considerate adevărați biomarkeri în cancerul uman.

Studii recente au evidențiat, de asemenea, importanța modificărilor epigenetice a anumitor gene care au ca rezultat inactivarea funcțiilor acestora în unele forme de cancer uman. Aceste aberații determină un comportament anormal comun tuturor celulelor neoplazice: exacerbară capacității de proliferare, lipsa inhibiției de contact, instabilitate genomică, și dobândirea capacității de invazie și metastazare.

Genele afectate de mutații în cancer sunt reprezentate de două clase principale: *oncogene* (apar în urma mutațiilor la nivelul proto-oncogenelor, fiind rezultatul unor mutații cu câștig de funcție, astfel pentru apariția bolii este necesară prezența unei alele mutante) și *gene supresoare tumorale* (acestea se manifestă ca gene recesive la nivel celular, pentru apariția bolii fiind necesară pierderea ambelor alele sau mutații la nivelul ambelor alele).

Până la ora actuală au fost identificate numeroase oncogene. Acestea sunt implicate în dezvoltarea sau evoluția cancerelor umane, dintre care unele sunt întâlnite într-un spectru

larg de afecțiuni maligne, în timp ce altele sunt asociate cu tipuri specifice de cancer. Descoperirea de noi oncogene sau gene supresoare tumorale care pot oferi perspective noi în diagnosticul cancerului, în estimarea evoluției clinice în cancer, în identificarea de noi ținte în terapia bolii canceroase și terapia personalizată reprezintă obiectivele principale ale oncogenomicii. Oncogenomica reprezintă o ramură nouă a genomicii care utilizează tehnologii de ultimă generație pentru a caracteriza genele asociate cu apariția neoplaziilor.

Tabelul 25.1 Oncogene activate frecvent în cancerele umane

Oncogene	Funcția celulară (funcția proteinei codificate)	Tipul de cancer	Frecvență (%)
C-MYC	Factor de transcripție	Cancer cervical	25-40
		Cancer esofagian	35-40
		Cancer mamar	20
		Cancer pulmonar, altul decât cel cu celule mici	15
CCDN1	Implicată în controlul ciclului celular	Cancer al capului /gâtului	50
		Cancer esofagian	
		Cancer mamar	25
		Cancer hepatic	20
			15
CDK4	Implicată în controlul ciclului celular	Sarcom	10-80
		Glioblastom	15
EGFR (ERBB1)	Receptor pentru factorul de creștere epidermal	Glioblastom	30-50
ERBB2 (HER2/neu)	Receptor pentru factorul de creștere epidermal	Meduloblastom	40
		Cancer mamar	20-35
		Cancer ovarian	20
		Cancer cervical	20
		Cancer pulmonar, altul decât cel cu celule mici	10
MET	Receptor transmembrantar pentru factorul de creștere hepatocitar, tirozin kinază	Cancer esofagian	80
		Meduloblastom	40
		Cancer gastric	10-20
PIK3CA	Lipid kinază	Meduloblastom	45
		Cancer mamar	40
		Cancer colorectal	30
		Cancer ovarian	15
MYC	Factor de transcripție	Limfom Burkitt	100
		Cancer ovarian	28-50
		Cancer mamar	20-30
		Cancer gastric	15-67

Oncogenele pot fi activate la nivelul celulelor somatice prin: mutații punctiforme (de exemplu familia genelor *RAS*); translocații cromozomiale (când se produce o genă himeră sau genă de fuziune sau dacă în urma translocației oncogenă ajunge în apropierea promotorului

altei gene, de exemplu oncogene *MYC* în limfomul Burkitt); amplificări genice (producerea a zeci sau sute de copii ale unui fragment de ADN/oncogene, de exemplu *NMYC*, *ERBB2*); modificări epigenetice (de exemplu hipometilarea promotorului); inserție virală sau prin alterarea expresiei unor gene microARN (ARNmi, gene care intervin în reglarea post-transcripțională a expresiei genice).

În cancer pot fi întâlnite gene himere (apărute frecvent în urma unei anomalii cromozomiale structurale, de exemplu translocării). De exemplu, cromozomul Philadelphia, întâlnit la 95% din cazurile cu leucemie mieloidă cronică (LMC), apare în urma unei translocării între cromozomii 9 și 22. Astfel în urma acestei translocării se formează o genă himeră (genă de fuziune) *BCR-ABL*, cu proprietăți noi, localizată pe cromozomul 22.

Tabelul 25.II Mutații în familia genelor RAS

Tipul de cancer	Frecvența mutației (%)	Familia genelor RAS
Cancer pancreatic	95	K-RAS
Cancer colorectal	50	K-RAS
Cancer pulmonar	30	K-RAS
Leucemie acută mieloidă (LAM)	25	N-RAS
Melanom	10	N-RAS

Genele supresoare tumorale blochează dezvoltarea neoplaziilor prin reglarea creșterii și proliferării celulare. În cancer, genele supresoare sunt inactivate, de obicei, prin mutații succesive ale ambelor alele, determinând pierderea funcției proteinei codificate de acestea. În cancerurile ereditare, persoanele respective au la naștere mutația iar pierderea heterozigozității (LOH) celei de a doua alele se produce printr-o mutație dobândită. Genele supresoare tumorale pot suferi mutații în cancerurile sporadice dar sunt descrise și mutații germinale moștenite.

Genele de stabilitate (cunoscute ca “gene caretaker” codifică proteine implicate în menținerea stabilității genomului, fiind implicate în repararea leziunilor de la nivelul ADN-ului. Mutațiile la nivelul genelor de stabilitate se asociază cu o frecvență mai mare a mutațiilor la nivelul întregului genom.

Genele microARN (ARNmi) codifică molecule mici de ARN necodant și duc la blocarea activității ARNm ținută după fixarea pe acesta. O caracteristică importantă a genelor ARNmi este reprezentată de posibilitatea funcționării atât ca oncogene, cât și ca gene supresoare tumorale, în funcție de genele pe care le reglează.

Anomaliile citogenetice, atât structurale (translocării, deleții și inversii) cât și numerice (aneuploidii, poliploidii) apar în majoritatea tumorilor hematopoietice dar și în tumorile solide. Anomaliile citogenetice, sunt consecința instabilității genomiale.

Anomaliile cromozomiale structurale întâlnite în cancer pot fi *echilibrate* (translocării reciproce și inversii) sau *neechilibrate* (constau în câștig de material genetic, de exemplu prin translocării cromozomiale neechilibrate, amplificări genice sau în pierderi de material genetic, de exemplu deleții care duc la monosomii parțiale sau complete).

Tabelul 25.III Gene supresoare tumorale inactivate în cancer

Gena supresoare tumorală	Localizare	Mecanism
<i>FHIT</i> (fragil histidine triad)	3p14	del
<i>PPARγ</i>	3p25-26	LOH
<i>APC</i>	5q21	LOH, hipermetilarea promotorului
<i>P16</i>	9p21	del, LOH
<i>RB1</i>	13q14	del
<i>TP53</i>	17p	LOH
<i>BRCA1</i>	17q21	del, metilare aberantă a promotorului
<i>BRCA2</i>	13q12-q13	del

LOH - pierderea heterozigotității, del - deleție

Tabelul 25.IV Anomalii cromozomiale și moleculare în hemopatiile maligne

Hemopatia malignă	Anomalia cromozomială/genică
Leucemia acută mieloidă (LAM)	t(8;21) [<i>AML1/ETO</i>] t(16;16)/inv(16) [<i>CBFβ-MYH11</i>] t(9;22) [<i>BCR-ABL</i>]
Leucemia acută promielocitară (LAM-M3)	t(15;17) [<i>PML-RARA</i>]
Leucemia acută limfoblastică (LAL)	<i>TEL-AML1</i> t(9;22) [<i>BCR-ABL</i>]
Leucemia mieloidă cronică (LMC)	t(9;22) [<i>BCR/ABL</i>]
Sindrom mieloproliferativ cronic (mielofibroză idiopatică MI, trombocitemie esențială TE, policitemia vera PV)	mutații <i>JAK2</i>
Limfom Burkitt	t(8;14) [<i>cMYC/IGH</i>]
Limfom folicular	t(14;18) [<i>IGH/BCL2</i>]

Carcinoamele renale cu celule clare sunt caracterizate de pierderea materialului genetic de pe brațul scurt (p) al cromozomului 3, 50% dintre aceste prezintă mutații somatice ale genei von Hippel-Lindau (*VHL*). Carcinoamele renale papilare sunt caracterizate de trisomii (cromozomii 3, 7, 12, 16, 17 și 20), deleții ale cromozomilor 18, 11, și 8 și deleția cromozomului Y. În carcinomul renal cromofob cele mai frecvente anomalii citogenetice sunt monosomia interesând mai ales cromozomii 1, 2, 6, 10, 13, 17, 21 și hipodiploidia. Cea mai frecventă anomalie cromozomială descrisă în carcinomul renal cu celule clare, deleția 3p/*VHL* sau chiar monosomia cromozomului 3 este considerată un factor de prognostic favorabil și se asociază cu un stadiu patologic incipient. Alte anomalii cromozomiale, cum sunt pierderea cromozomului Y, trisomia 7, deleția brațului scurt al cromozomului 9, deleția la nivelul cromozomului 14 și 18, sunt considerați factori de prognostic nefavorabil.

În **carcinoamele hepatocelulare** apar anomalii citogenetice complexe (interesează mai mulți cromozomi), unele anomalii cromozomiale sunt mai frecvente (20-35%) dar nu se

asociază cu un anumit tip tumoral [i(8)(q10), del(1p), +7, -5, -8, -13, -21 și -22]. Studiile de hibridizare genomică comparativă CGH pot identifica deleții (del) sau inserții (ins) cromozomiale chiar submicroscopice. Amplificările de material genetic apar mai ales la nivelul 1q (57.1%), 8q (46.6%), 6p (22.3%), 17q (22.2%) în timp ce delețiile apar mai ales la nivelul 8p (38%), 16q (35.9%), 17p (32.1%), și 13q (26.2%). În leziunile premaligne, anomaliile cromozomiale sunt reprezentate de amplificări, mai frecvente la nivel 1q și 8q, iar delețiile apar mai ales la nivel 8p, 17p, 5p, 13q, 14q și 16q. Acumularea anomaliilor cromozomiale neechilibrate, inclusiv adiția 8q, se asociază cu progresia tumorală. S-a observat că del(1p) apare în carcinomul hepatocelular bine diferențiat, în nodulii displazici cât și ciroză hepatică, ceea ce sugerează faptul că instabilitatea cromozomială poate să apară într-un stadiu incipient în timpul carcinogenezei hepatice, înainte de apariția unui fenotip malign.

În cancerle esofagiene, modificările citogenetice sunt frecvente și reprezintă un indicator clinic și biologic ideal. Analiza citogenetică permite descoperirea unor anomalii recurente sau noi, importante în dezvoltarea cancerului. Deși nu există anomalii cromozomiale specifice tumorilor esofagiene, totuși s-a observat că în stadiile avansate (stadiul III și IV) apare mai frecvent câștigul cromozomial la nivel 12p și deleția 3p, aberații care se asociază cu o durată scurtă de supraviețuire.

Tabelul 25.V Modificări citogenetice în cancerul esofagian

	Pierderi de material genetic	Câștig de material genetic	Rearanjări cromozomiale
Carcinoame esofagiene cu cel scuamoase (ESCC)	13q; 11q; 14q; 8q; 5p; 7q; 15q; 20q; 1q; 7p; 1p; Xq; 2p; 12p; 14q; 20p	3p; 4q; 4p; 5q; 13q; 21q; 3q; 9p; 19p	t(3;7)(p21;q11) der(11)t(4; 11) (q27;q23) der(1)t(7;11)(p?15;p?13)
Adenocarcinoame esofagiene (EAC)	8q; 22p; 12; 17; 11p; 20q; 6; 7; 11; 8; 2p; 7p; 10q; 6p; 14; 15q; 17q; 20	18; 17p; 4; 21; 18q; Y; 4q; 5q; 9p; 7q; 14q; 4	pot interesa toate brațele cromozomiale, mai frecvent 1p; 3q; 22p; 11p; i(3q); i(13q); i(14q); excepție: 10p, 16q, 18q, 19p, 20q, X

i - izocromozom; p - braț scurt; q - braț lung; der - cromozom derivat; t - translocăție

O caracteristică a neoplaziilor o reprezintă evoluția multistadială a acestora. Cancerul se dezvoltă, în majoritatea cazurilor, dintr-o singură celulă, care va duce la apariția unei clone celulare neoplazice. La nivelul acesteia se vor produce modificări genetice și epigenetice. În general, sunt necesare 6-7 mutații succesive la nivelul unei celule pentru transformarea în celulă canceroasă.

Evoluția multistadială a cancerelor presupune:

- imortalizarea celulelor tumorale (capacitate de proliferare nelimitată); acest lucru este susținut și de faptul că în aproximativ 90% din neoplazii telomeraza este reactivată (de exemplu MYC determină activarea telomerazei, acesta fiind unul

din mecanismele implicate în carcinogeneza hepatică). Dar în 10% din cancere telomeraza nu este reactivată și totuși are loc o proliferare necontrolată. Astfel se poate presupune că pe lângă reactivarea telomerasei intervin și alte mecanisme (de exemplu inactivarea unor căi de control a ciclului celular). S-a observat că celulele imortalizate prezintă modificări cromozomiale, reprezentate de aneuploidii.

- modificări epigenetice (prin epigenetică se înțeleg modificările la nivelul cromatinei, dar fără modificări în secvența nucleotidică și care pot influența expresia genică). Modificările epigenetice sunt reprezentate de: modificarea metilării (hipometilarea ADN, poate determina activarea oncogenelor, fiind întâlnită în tumora Wilms, cancerul de colon, cancerul gastric, hipometilarea globală se asociază cu instabilitate cromozomială; hipermetilarea ADN determină inactivarea unor gene supresoare tumorale, de exemplu în cancerul esofagian; inactivarea locusului *CDKN2A* este întâlnită în foarte multe cancere; metilarea genelor supresoare tumorale a fost observată la subiecții cu risc ridicat de cancer esofagian, chiar și cu 9 ani înainte de diagnosticul clinic, astfel profilul metilării ADN-ului poate oferi un instrument unic pentru a prezice statusul cancerului, de asemenea s-a observat că metilarea promotorului proteinei *p16INK4A* apare în fazele precoce ale carcinomului hepatocelular și se asociază cu represiunea funcției, înțelegerea modelelor de metilare în carcinomul hepatocelular e utilă pentru a determina recurența și rata de supraviețuire); modificarea histonelor (metilare, acetilare, întâlnite frecvent în cancere).

Tabelul 25.VI Gene hipermetilate în cancere

Gena	Cancere asociate cu hipermetilare
RB1	Retinoblastom
CDKN2A	multe cancere (carcinom hepatocelular)
VHL	carcinom renal cu celule clare
GSTP1	carcinom de prostată
FHIT	cancer esofagian

- mutații la nivelul ADN-ului mitocondrial (apar frecvent în cancerul de colon, stomac, în 5% din cancerele esofagiene, dar sunt prezente și în leziunile pre-neoplazice, de exemplu esofag Barret). Studii recente consideră că analiza mutațiilor la nivelul ADN-ului mitocondrial ar putea reprezenta un biomarker în analiza precoce a cancerelor.
- angiogeneza tumorală (celulele canceroase secretă numeroși factori angiogenetici, ca de exemplu factorul de creștere endotelial vascular VEGF, factorul de creștere fibroblastic FGF1, FGF 2; activarea oncogenei RAS sau inactivarea unor gene supresoare tumorale *TP53* determină hiperexpresia genei VEGF).
- reprogramarea metabolismului energetic (mutațiile la nivelul genei pentru izocitrat dehidrogenază *IDH1* și *IDH2*);

- sustragerea de sub mecanismul de apărare antitumorală;
- invazia și metastazarea (sunt controlate de gene care promovează invazia și metastazarea, de exemplu *VEGF*, *FGF* și de gene supresoare ale metastazării, de exemplu *NM23*);

25.2 METODE DE DETECTARE A MODIFICĂRILOR GENETICE ÎN NEOPLAZII

Metodele folosite pentru a detecta modificările genetice în neoplazii (mai ales hematologice) includ:

- citogenetica convențională (cariotiparea pe celulele derivate din preparatele directe sau din culturile celulare, și se folosește, cel mai frecvent, marcajul cromozomial G);
- citogenetică moleculară, de exemplu hibridizare fluorescentă in situ (FISH), multicolor FISH, și cariotipare spectrală (SKY);
- tehnici moleculare pentru analiza ADN, ARN, sau a proteinelor (de exemplu PCR, RT-PCR, Q-PCR, Southern blot), și analiza microrețelelor (microarray).

Citogenetica convențională, folosind cariotiparea clasică a cromozomilor rămâne metoda recomandată de evaluare a anomaliilor cromozomiale, mai ales a aberațiilor cromozomiale numerice și structurale. Problemele tehnice asociate analizelor citogenetice (de exemplu, necesitatea utilizării doar a probelor proaspete, existența celulelor în diviziune, dificultățile în identificarea anomaliilor cromozomiale submicroscopice sau criptice din cauza rezoluției limitate) au dus la o creștere a utilizării tehnicilor de citogenetică moleculară, cum ar fi FISH, pentru a identifica anomalii specifice care sunt utile în diagnosticul sau managementul neoplaziilor (mai ales în afecțiunile hematologice maligne). Automatizarea și sensibilitatea ridicată au dus la utilizarea tot mai frecventă a tehnicilor bazate pe PCR în diagnostic și mai ales în monitorizarea bolii.

Analizele citogenetice se realizează pe cromozomi metafazici sau prometafazici, obținuți direct din țesuturi cu activitate mitotică intensă (măduvă osoasă, țesut tumoral) sau din culturi celulare (sânge periferic, țesut tumoral, măduvă osoasă, etc). După prelucrarea propriu-zisă a probelor biologice se realizează marcajul cromozomial G prin care se face o digestie controlată cu tripsină urmată de colorarea cu Giemsa ceea ce permite identificarea cromozomilor. Limita de rezoluție în analiza citogenetică convențională este de 5Mb.

Tehnicile de citogenetică moleculară permit identificarea unor anomalii cromozomiale mai mici, și anume < 5Mb. Acestea au ca și principiu hibridizarea prin complementaritate între o sondă ADN (fragment de ADN monocatenar) și o țintă de ADN genomic (fragmentul ADN de analizat, aceste putând proveni din cromozomi metafazici, din nucleii interfazici, sau poate fi analizat întregul cromozom sau genom).

Tehnica FISH folosește sonde marcate cu fluorocromi și permite analiza cromozomilor metafazici (detectează deleții sau duplicații submicroscopice folosind sonde locus specifice), analiza nucleilor interfazici (permite diagnosticul rapid, fără a mai fi necesară efectuarea culturilor celulare, se folosesc sonde centromerice). Prin FISH se pot evidenția și translocații cromozomiale, genele de fuziune, se pot caracteriza anomaliile cromozomiale structurale

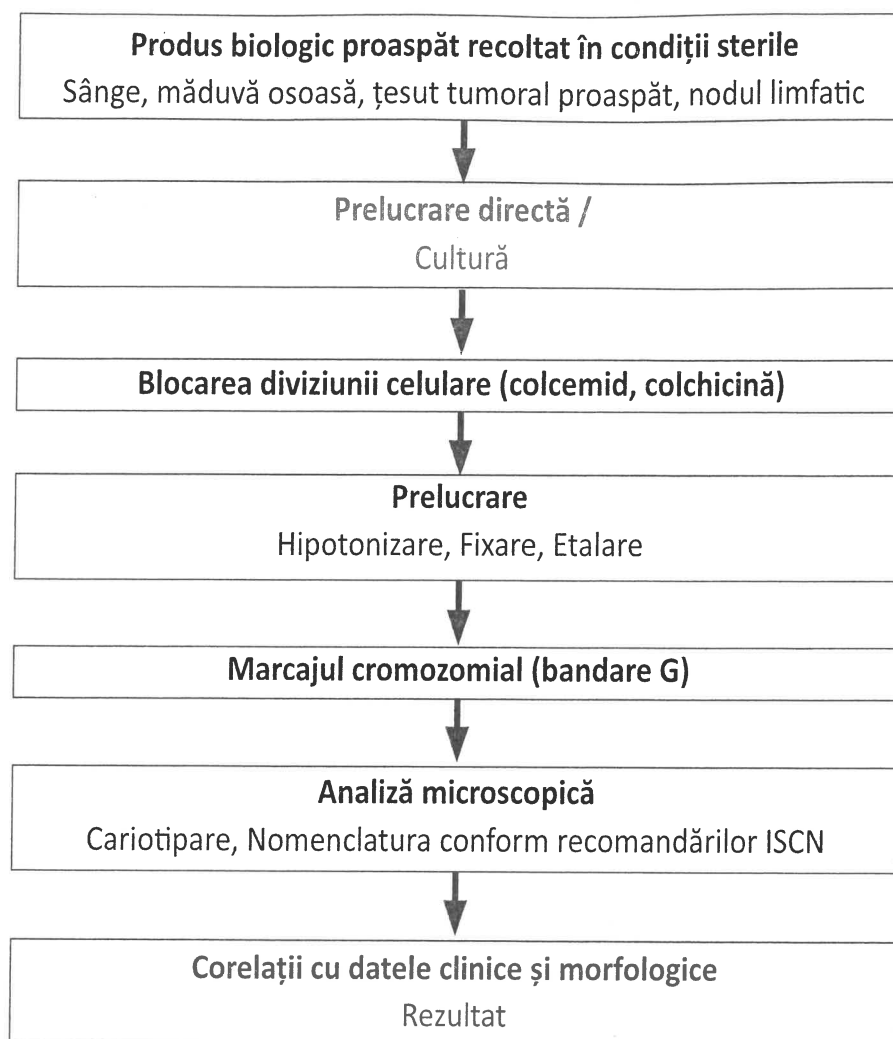


Figura 25.1 Algoritm de analiză citogenetică

complexe (utilizarea de exemplu a sondelor *IGH/MYC/CEP 8* tri-color, dual fusion – în limfomul Burkitt, *BCR/ABL* tri-color, dual fusion – în leucemia mieloidă cronică, *PML/RARA* dual color, dual fusion – în leucemia acută promielocitară).

FISH poate fi utilizată atât pe probe proaspete (inclusiv suspensii celulare fixate cu metanol și acid acetic glacial) cât și pe țesuturi incluse în parafină.

Multe anomalii cromozomiale și moleculare definesc entități hematologice specifice și au un impact terapeutic și valoare prognostică.

Un subgrup semnificativ de tumori maligne hematopoietice nu prezintă anomalii cromozomiale la examenul citogenetic convențional și doar analizele moleculare pot identifica mutațiile genice. De exemplu, mutațiile la nivelul genei *FLT3* (fms-related tyrosine kinase 3) sunt cele mai frecvente mutații în LAM (~20-30% din totalul LAM, și ~70% la cei cu un cariotip normal). De asemenea, mutațiile *MLL* apar mai ales în LAM citogenetic normale. Tehnicile de diagnostic molecular, mai ales PCR cantitativ în timp real (qPCR sau Q-PCR), joacă un rol important în monitorizarea pacienților după tratament, fiind cel mai bine documentate la pacienții cu LMC cărora li se administrează Imatinib (Gleevec).

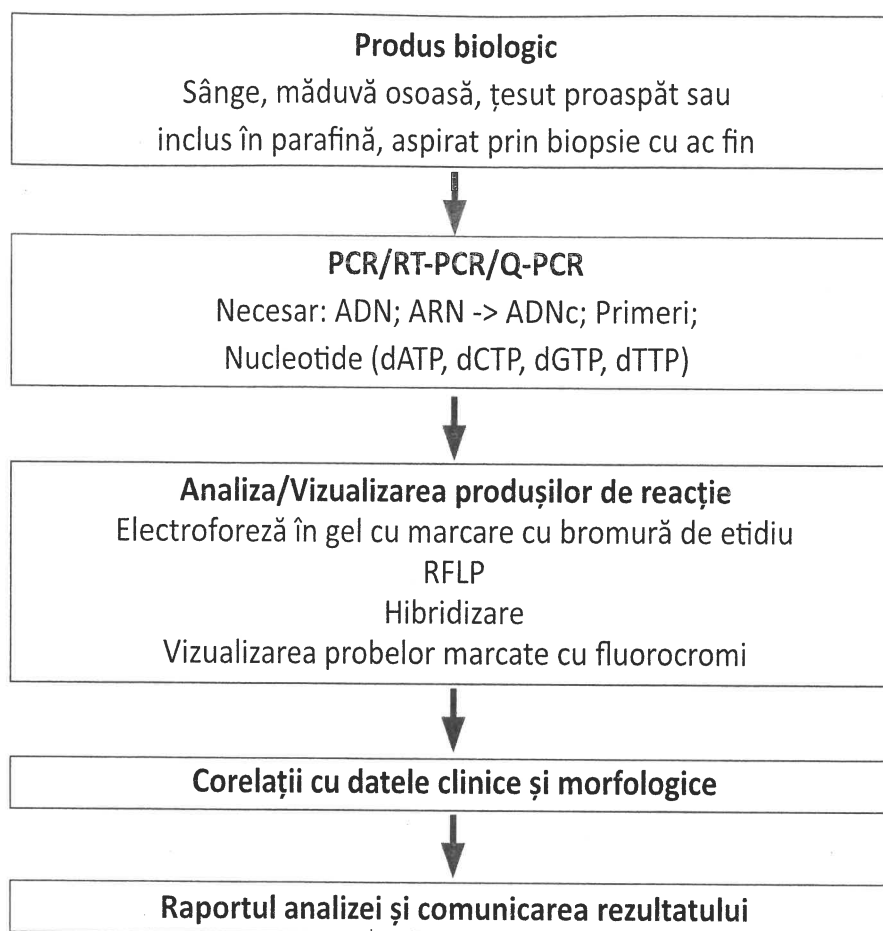


Figura 25.2 Algoritm de analiză prin tehnici bazate pe PCR

25.3 UTILIZAREA MARKERILOR CROMOZOMIALI ȘI MOLECULARI ÎN MONITORIZAREA BOLII REZIDUALE MINIME

Analizele citogenetice convenționale, FISH, și analizele moleculare sunt folosite de obicei în diagnosticul afecțiunilor maligne hematologice și, în plus, sunt și cu valoare prognostică și permit evaluarea bolii minime reziduale (BMR).

Analiza citogenetică, obligatorie în evaluarea pacienților cu leucemii mieloide sau limfoide, este utilă împreună cu imunofenotiparea pentru stabilirea diagnosticului, a subtipului de boală, și este esențială în evaluarea progresiei bolii. Sondele FISH, disponibile pentru mai multe anomalii cromozomiale comune, oferă adesea avantaje față de citogenetica clasică, prin detectarea anomaliilor cromozomiale submicroscopice.

Analiza citogenetică, FISH și analiza moleculară au un rol important în monitorizarea bolii pentru a determina răspunsul la tratament, BMR, și pentru a evidenția cât mai precoce recidiva bolii. Evidențierea BMR are valoare prognostică în LAL și LAM. Tehnicile de diagnostic molecular, mai ales PCR cantitativ în timp real (qPCR sau Q-PCR), vizează genele de fuziune rezultate în urma anomaliilor cromozomiale (de exemplu, BCR/ABL), chimerism (de exemplu, repetiții scurte în tandem, STR).

Analiza genelor de fuziune poate fi utilă pentru monitorizarea BMR în anumite leucemii acute asociate cu translocatii cromozomiale (de exemplu, MLL)

Motivul care stă la baza depistării BMR este de a îmbunătăți răspunsul la tratament (mai ales imediat după terapia de inducție), pentru a oferi informații prognostice, precum și pentru a optimiza și adapta terapia la răspunsul molecular prin identificarea pacienților cu risc scăzut sau risc ridicat, care pot beneficia de intensificarea tratamentului sau de consolidare.

25.4 EVALUARE STATUSULUI DE METILARE

Cele mai multe metode de evaluare a metilării ADN-ului încep cu o etapă de pre-tratament specific metilării, urmată de reacția polimerizării în lanț (PCR) și se încheie cu detectarea modelului de metilare. Alegerea finală a metodei (detectarea modelului de metilare) este influențată de sensibilitatea metodei, de timpul de rulare a metodei, volumul și calitatea probei de ADN, dacă se dorește analiza cantitativă față de cea calitativă a metilării.

Metodele de pre-tratare specifice metilării pot fi: tratarea cu bisulfit de sodiu, digestia cu enzime de restricție, etc.

Analiza modelului de metilare se poate realiza folosind următoarele metode:

- **PCR specific de metilare** (methylation specific PCR, MS-PCR, metoda constă în amplificarea prin PCR a capătului 5' al genei de interes cu primeri specifici de metilare în scopul determinării modelului de metilare la CpG din regiunea respectivă, metilarea se produce frecvent la nivelul dinucleotidelor CpG),
- **metoda HRM** (High resolution melting). Profilele curbelor de topire a produșilor PCR după o pre-tratare cu bisulfit pot fi folosite pentru a indica gradul de metilare, atunci când probele de analizat sunt comparate atât cu controale metilate, respectiv nemetilate. Această metodă implică o pre-tratare cu bisulfit, urmată de amplificarea PCR a ambelor probe metilate și nemetilate ale regiunilor de interes. Metodele mai noi MS-HRM (methylation-sensitive HRM) sunt mai sensibile și necesită o reacție PCR într-un singur tub.
- **tehnica MS-MLPA** (analiza de metilare-MLPA, Methylation-specific MLPA) se bazează pe tehnica MLPA, fiind o metodă semicantitativă folosită pentru cuantificarea numărului de copii și stabilirea gradului de metilare. MS-MLPA este folosită pentru analiza aberațiilor de metilare în tumori și pentru evidențierea modificărilor epigenetice. MS-MLPA este frecvent utilizată în analiza tumorilor, și anume pentru a determina inactivarea transcripțională a genelor supresoare tumorale care pot duce la progresia tumorii sau rezistență la chimioterapice.
- **Analiza microrețelelor (DNA microarrays)**. Platformele de microarray permit analiza secvențelor tratate cu bisulfit, a ADN-ului tratat cu enzime de restricție.
- **Secvențierea de generație nouă** (Next generation sequencing) permite cuantificarea exactă a secvențelor tratate cu bisulfit (dinucleotidele CpGs metilate versus nemetilate) și este considerată standardul de aur în cadrul analizelor secvențelor metilate.

25.4 ANALIZA POLIMORFISMELOR MONONUCLEOTIDICE ÎN CANCER

Studiile de asociere la nivel întregului genom (GWAS) au permis identificarea unor loci implicați în cancer. La nivelul acestor loci se găsesc variante genice comune care pot determina o creștere a riscului de apariție a cancerului comparativ cu cel înregistrat în populația generală. De asemenea studiile caz-control care au realizat genotiparea a sute de mii de polimorfismele mononucleotidice (SNP) au permis identificarea alelelor asociate cu un risc crescut de cancer. Astfel au fost identificate SNP-uri la nivelul genelor implicate în codificarea unor proteine reglatoare ale ciclului celular și susceptibilitatea la cancer.

S-a descris un SNP situat în exonul 4 al genei *TP53* (are un rol important în suprimarea creșterii și funcțiile apoptotice), care determină o substituție a argininei cu prolina în codonul 72 și se asociază cu dezvoltarea timpurie a cancerelor.

Tabelul 25.VII Polimorfisme genetice implicate în predispoziția la cancer

Gena	Polimorfism	Funcția genei
<i>GST M1</i>	deleție	metabolismul xenobioticelor
<i>GST T1</i>	deleție	metabolismul xenobioticelor
<i>MTHFR</i>	substituție/înlocuirea aminoacizilor (C677T, A1298C)	biosinteză
<i>SOD (MnSOD)</i>	substituție (Val16Ala)	antioxidant
<i>GSTP1</i>	substituție (Ile105Val)	
<i>XRCC1</i>	substituție/înlocuirea aminoacizilor (Arg399Gln, Arg194Trp)	reparare ADN
<i>XRCC3</i>	substituție/înlocuirea aminoacizilor (Thr241Met)	reparare ADN
<i>XPD</i>	substituție/înlocuirea aminoacizilor (Lys751Gln)	reparare ADN
<i>TP53</i>	substituție/înlocuirea aminoacizilor	controlul stabilității genomiale
<i>STAT3</i>	substituție	factor de transcripție, implicat în răspunsul imun, inflamație și tumorigeneză

SNP-urile pot fi analizate prin diferite metode: PCR-RFLP, ARMS-PCR, HRM, tehnologia Real Time PCR sau PCR cantitativ în timp real (qPCR sau Q-PCR), MLPA.

Bibliografie selectivă

1. Bunz F. Principles of Cancer Genetics. Publisher Springer, 2010, 49-124.
2. Chava S, Kaliq MD, Nagarjuna P, Latha M, Sireesha V, Shetty P et al. Epigenetic and esophageal cancer: role of altered methylation in specific genes. Int.J.Cancer res. 2011, 7(3):233-243
3. Covic M. Genomica bolii canceroase. Viața medicală, 2012, 46(1192).
4. Dagher J, Dugay F, Verhoest G, Cabillic F, Jaillard S, Henry C, et al. Histologic prognostic factors

25.4 ANALIZA POLIMORFISMELOR MONONUCLEOTIDICE ÎN CANCER

Studiile de asociere la nivel întregului genom (GWAS) au permis identificarea unor loci implicați în cancer. La nivelul acestor loci se găsesc variante genice comune care pot determina o creștere a riscului de apariție a cancerului comparativ cu cel înregistrat în populația generală. De asemenea studiile caz-control care au realizat genotiparea a sute de mii de polimorfismele mononucleotidice (SNP) au permis identificarea alelelor asociate cu un risc crescut de cancer. Astfel au fost identificate SNP-uri la nivelul genelor implicate în codificarea unor proteine reglatoare ale ciclului celular și susceptibilitatea la cancer.

S-a descris un SNP situat în exonul 4 al genei *TP53* (are un rol important în suprimarea creșterii și funcțiile apoptotice), care determină o substituție a argininei cu prolina în codonul 72 și se asociază cu dezvoltarea timpurie a cancerelor.

Tabelul 25.VII Polimorfisme genetice implicate în predispoziția la cancer

Gena	Polimorfism	Funcția genei
<i>GST M1</i>	deleție	metabolismul xenobioticelor
<i>GST T1</i>	deleție	metabolismul xenobioticelor
<i>MTHFR</i>	substituție/înlocuirea aminoacizilor (C677T, A1298C)	biosinteză
<i>SOD (MnSOD)</i>	substituție (Val16Ala)	antioxidant
<i>GSTP1</i>	substituție (Ile105Val)	
<i>XRCC1</i>	substituție/înlocuirea aminoacizilor (Arg399Gln, Arg194Trp)	reparare ADN
<i>XRCC3</i>	substituție/înlocuirea aminoacizilor (Thr241Met)	reparare ADN
<i>XPB</i>	substituție/înlocuirea aminoacizilor (Lys751Gln)	reparare ADN
<i>TP53</i>	substituție/înlocuirea aminoacizilor	controlul stabilității genomiale
<i>STAT3</i>	substituție	factor de transcripție, implicat în răspunsul imun, inflamație și tumorigeneză

SNP-urile pot fi analizate prin diferite metode: PCR-RFLP, ARMS-PCR, HRM, tehnologia Real Time PCR sau PCR cantitativ în timp real (qPCR sau Q-PCR), MLPA.

Bibliografie selectivă

1. Bunz F. Principles of Cancer Genetics. Publisher Springer, 2010, 49-124.
2. Chava S, Kaliq MD, Nagarjuna P, Latha M, Sireesha V, Shetty P et al. Epigenetic and esophageal cancer:role of altered methylation in specific genes. Int.J.Cancer res. 2011, 7(3):233-243
3. Covic M. Genomica bolii canceroase. Viața medicală, 2012, 46(1192).
4. Dagher J, Dugay F, Verhoest G, Cabillie F, Jaillard S, Henry C, et al. Histologic prognostic factors

- associated with chromosomal imbalances in a contemporary series of 89 clear cell renal cell carcinomas. *Hum Pathol.* 2013;44(10):2106-15.
5. Gorczyca W. Cytogenetics, FISH and Molecular Testing in Hematologic Malignancies, Informa Healthcare United Kingdom, 2008, 31-108.
 6. Hashimoto K, Mori N, Tamesa T, Okada T, Kawauchi S, Oga A, et al. Analysis of DNA copy number aberrations in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinomas by conventional CGH and array CGH. *Mod Pathol.* 2004;17(6):617-22.
 7. He G, Karin M. NF- κ B and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res.* 2011;21(1):159-68.
 8. Klatte T, Pantuck AJ, Said JW, Seligson DB, Rao NP, LaRochelle JC et al. Cytogenetic and molecular tumor profiling for type 1 and type 2 papillary renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(4):1162-9.
 9. Kumar M, Zhao X, Wang XW. Molecular carcinogenesis of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: one step closer to personalized medicine? *Cell Biosci.* 2011;1(1):5.
 10. La Rochelle J, Klatte T, Dastane A, Rao N, Seligson D, Said J et al. Chromosome 9p deletions identify an aggressive phenotype of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer.* 2010;116(20):4696-702.
 11. Mills K. Molecular Analysis of Cancer: An Overview. Boultonwood J, Fidler C. *Molecular Analysis of Cancer (Methods in Molecular Medicine).* Humana Press, 2001, 1-6.
 12. Monzon FA, Alvarez K, Peterson L, Truong L, Amato RJ, Hernandez-McClain J et al. Chromosome 14q loss defines a molecular subtype of clear-cell renal cell carcinoma associated with poor prognosis. *Mod Pathol.* 2011;24(11):1470-9.
 13. Nishida N, Nishimura T, Ito T, Komeda T, Fukuda Y, Nakao K. Chromosomal instability and human hepatocarcinogenesis. *Histol Histopathol.* 2003 Jul;18(3):897-909.
 14. O'Sullivan E, Goggins M. DNA methylation analysis in human cancer. *Methods Mol Biol.* 2013; 980:131-56.
 15. Patil MA, Gütgemann I, Zhang J, Ho C, Cheung ST, Ginzinger D, et al. Array-based comparative genomic hybridization reveals recurrent chromosomal aberrations and Jab 1 as a potential target for 8q gain in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 26(12):2050-2057
 16. Reid-Nicholson MD, Motiwala N, Drury SC, Peiper SC, Terris MK, Waller JL et al. Chromosomal abnormalities in renal cell carcinoma variants detected by Urovysion fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded tissue. *Ann Diagn Pathol.* 2011;15(1):37-45.
 17. Sandovici I, Ștefănescu D, Covic M. *Genetica Bolii Canceroase*, Covic M, Ștefănescu DT, Sandovici I. *Genetică medicală, ediția a II-a*, Editura Polirom, 2011, 586-618.
 18. Schulz WA. *Molecular Biology of Human Cancers An Advanced Student's Textbook.* Publisher Springer United States of America, 2005.
 19. Shimada H, Matsushita K, Tagawa M. Recent advances in esophageal cancer gene therapy. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Feb;14(1):3-8.
 20. Sperga M, Martinek P, Vanecek T, Grossmann P, Bauleth K, Perez-Montiel D et al. Chromophobe renal cell carcinoma-chromosomal aberration variability and its relation to Paner grading system: an array CGH and FISH analysis of 37 cases. *Virchows Arch.* 2013;463(4):563-73.

21. Sui G, Zhou S, Wang J, Canto M, Lee EE, Eshleman JR et al. Mitochondrial DNA mutations in preneoplastic lesions of the gastrointestinal tract: a biomarker for the early detection of cancer. *Mol Cancer*. 2006, 13;5:73.
22. Tanaka K; Hirabayashi N. Cytogenetic Studies of Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Gastric Adenocarcinoma Cell Lines. *Indian Journal of Science and Technology*, 2011, may: 468-476, Available at: <http://www.indjst.org/index.php/indjst/article/view/30044>
23. Yu W, Zhang W, Jiang Y, Wang Y, Li Y, Wang J, et al. Clinicopathological, genetic, ultrastructural characterizations and prognostic factors of papillary renal cell carcinoma: new diagnostic and prognostic information. *Acta Histochem*. 2013; 115(5):452-9.

26

Tehnici de diagnostic molecular

Claudia Bănescu

Genetica și analiza genomului uman au devenit parte integrantă a medicinei dar și a sănătății publice. Determinarea caracteristicilor moleculare complete ale bolilor genetice furnizează informații suplimentare pentru diagnostic. În plus, identificarea unor mutații familiale permit consilierea genetică a familiei și chiar în anumite situații a diagnosticului prenatal sau diagnosticul genetic preimplantatoriu (PGD) pentru sarcinile viitoare.

Diagnostic molecular s-a dezvoltat considerabil în ultimele decenii, beneficiind de progresele obținute în cercetarea geneticii umane și de tehnologiile de ultimă generație. Inițial, laboratoare de cercetare și-au dezvoltat tehnicile utilizate pentru analiza mutațiilor genetice. Metodologia diagnosticului molecular se bazează pe diagnosticul indirect al mutațiilor prin analiza haplotipului (reprezintă combinația de gene nealele de pe același cromozom care se transmit împreună) și analize de înlănțuire, care sunt extrem de laborioase, necesită cantități mari de ADN, și nu au permis întotdeauna obținerea a unui rezultat ușor de interpretat. Cu toate acestea, au oferit o bază pentru diagnosticul molecular așa cum e cunoscut în prezent, iar unele dintre aceste tehnici sunt încă folosite în prezent. Descoperirea reacției de polimerizare în lanț (PCR) a revoluționat diagnosticul molecular.

Genetica moleculară folosește metodele de genetică și biologie moleculară pentru a studia structura și funcția genelor la nivel molecular facilitând astfel înțelegerea expresiei și reglării activității genelor, precum și interacțiunea dintre gene, identifică mecanismele moleculare implicate în producerea patologiei umane favorizând introducerea unor noi metode de investigare moleculară, utile atât pentru diagnostic cât și pentru tratament.

Metodele de analiză genetică folosite în diagnostic dar și în cercetare se pot realiza fie la nivel de ARN (transcriptom), ADN (genom) sau epigenom.

Tehnicile pentru diagnostic molecular sau tehnicile de genetică moleculară au drept obiect de studiu ADN-ul și ARN-ul celular. Tehnicile de diagnostic molecular presupun izolarea și purificarea acizilor nucleici și punerea în evidență a mutațiilor genice.

Prima etapă a metodelor de investigare moleculară o reprezintă izolarea acizilor nucleici, care vor fi utilizați în următoarele etape de analiză moleculară. Pentru obținerea ADN poate fi folosită orice probă biologică, indiferent de origine. Pentru obținerea ADN sau ARN se folosește cel mai frecvent sângele integral (recolat pe anticoagulant, de obicei EDTA). ADN-ul

se mai poate izola din: lichid amniotic, culturi celulare, culturi bacteriene, salivă, fragmente de țesuturi obținute prin biopsii, virusuri, fragmente incluse în parafină (acestea putând fi utilizate și în studiile retrospective), urină, celule obținute prin lavaj sau aspirație, etc. Putem afirma că există două tipuri de țesuturi care pot fi utilizate în vederea extracției de ADN, și anume: proaspete (cele mai folosite) și conservate (de exemplu țesuturi incluse în parafină).

Tabelul 26.1 Tehnici utilizate în laboratoarele de diagnostic molecular

Tehnici utilizate în laboratoarele de diagnostic molecular
<i>Analiza mutațiilor cunoscute</i> Tehnica PCR – RFLP (Polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție) Tehnica ARMS-PCR (Detectarea mutațiilor prin amplificare refractară) Tehnica ASO (Analiza cu sonde oligonucleotidice specifice alelelor) Tehnologia qPCR sau Q-PCR (Real Time PCR sau PCR cantitativ în timp real) Pirosecvențiere
<i>Identificarea mutațiilor necunoscute</i> Tehnica SSCP (Polimorfismul conformațional al monocatenelor) Secvențiere Sanger Secvențierea de nouă generație (NGS) Testul proteinelor trunchiate DGGE (Electroforeza în gel cu gradient de denaturare)
<i>Identificarea variației numărului de copii</i> Tehnica Southern blot Tehnica MLPA (Amplificare cu probe de înaltă specificitate a regiunii de interes) aCGH (Array CGH, hibridizare genomică comparativă) Analiza polimorfismelor mononucleotidice (SNP)

Protocoloalele de extracție a acizilor nucleici diferă în funcție de tipul probei, astfel separarea acestora se face în funcție de proprietățile fizico-chimice ale acestora prin:

- Metode în fază lichidă (metoda cloroform-fenol, care este o tehnică de extracție care permite separarea în gradient de densitate a unui amestec de cloroform-fenol, soluție apoasă care conține proba biologică și denaturantul folosit),
- Metode în fază solidă, prin adsorbție (coloane, membrane de siliciu care au capacitatea de a lega acizii nucleici sau bile magnetice), metode folosite în cazul utilizării kiturilor comerciale.

Avantajele metodei cloroform-fenol sunt reprezentate de faptul că este o tehnică relativ ieftină, iar acizii obținuți sunt de puritate ridicată. Dezavantajele acestei metode sunt reprezentate de faptul că este o tehnică de durată, iar reactivii folosiți sunt toxici, fiind necesară manipularea atentă a acestora.

Kit-urile comerciale, conțin de obicei toți reactivii necesari pentru efectuarea extracției ADN, respectiv ARN și sunt mai rapide (majoritatea kiturilor existente permit extracția ADN-ului din sânge în maxim 30 de minute). Avantajele folosirii kiturilor sunt: rapiditatea și ușurința utilizării acestora, nu sunt toxice, sunt reproductibile. Dezavantajele sunt reprezentate de costurile ridicate, riscul contaminării între tuburi, pierderea de material (fragmente < 150-200 perechi de baze, pb).

Extracția acizilor nucleici se poate face manual sau cu ajutorul sistemelor automate.

Există mai multe kit-uri pentru extracția ADN-ului care diferă în funcție de principii metodei, și anume:

- Precipitarea cu etanol, spălarea și apoi rehidratarea ADN-ului (situație în care ADN-ul devine vizibil pe parcursul ultimelor etape ale extracției)
- Extracția rapidă a ADN-ului cu ajutorul unei coloane prevăzută cu o membrană silica [datorită legării acizilor nucleici la membrană în funcție de pH și de soluția tampon (buffer utilizată)], urmată de eluarea sa (desprinderea cu soluție de eluare sau apă fără nucelaze) într-un tub de colectare, situație în care ADN-ul nu este vizibil (PureLink Genomic DNA Kit, Quick-gDNA MiniPrep)
- Izolarea cu bile magnetice, această metodă se bazează pe fixarea acizi nucleici pe aceste bile magnetice introduse în soluția de liză, urmate de spălări succesive (cu etanol) și desprinderea acizii nucleici cu ajutorul soluției de eluare (MagJET DNA și RNA Purification Kits).

În cazul țesuturilor incluse în parafină, se preferă utilizarea acelor probe incluse în parafină cu punct de topire între 56 - 58°C, deoarece temperatura înaltă duce la degradarea probei și obținerea unor cantități mici de acizi nucleici.

Sistemele de extracție automată a acizilor nucleici existente sunt de două tipuri:

- Sisteme care nu necesită centrifugare, și permit izolarea rapidă a acizilor nucleici (ADN, ARN) în 6-10 minute, din diverse probe precum: sânge, țesut, culturi celulare. Aceste sisteme folosesc pentru extracție membrane poroase, permițând extracția rapidă (de exemplu FujiFilm Quick Gene).
- Sisteme de extracție cu microparticule magnetice, acestea permit extracția de ADN/ARN din sânge, virusuri, țesuturi, bacterii, urină, linii celulare.

Avantajul sistemelor de extracție automată a acizilor nucleici:

- reduc la minim riscul expunerii și contaminările încrucișate,
- asigură o cantitate suficient de mare de acizi nucleici de puritate ridicată,
- permit utilizarea simultană a unui număr mare de probe,
- operare ușoară.

Dezavantajul sistemelor de extracție automată a acizilor nucleici:

- sunt costisitoare.

Metodele de izolare a acizilor nucleici au ca și criterii de bază concentrația și puritatea ADN/ARN-ului obținută.

Cuantificarea acizilor nucleici

Aceasta se realizează cu ajutorul spectrofotometrului. **Cuantificarea** spectrofotometrică (spectrofotometrul, de exemplu Nanodrop ND-3300 UV-VIS), permite măsurarea directă a absorbanțelor la două lungimi de undă diferite (260 nm și 280 nm), pentru aceeași probă (posibilă datorită proprietății acizilor nucleici de a absorbi lumina ultravioletă la lungimea de undă de 260 nm și a proteinelor de a absorbi UV la 280 nm). **Puritatea** acizilor nucleici

se apreciază cel mai fidel prin raportul dintre absorbanta la 260 nm și absorbanta la 280 nm, și anume A_{260}/A_{280} .

Pentru ADN în mod normal valoarea A_{260}/A_{280} este între 1.6 și 2, cu o valoare optimă de 1.8. Valorile mai mici de 1.6 ale acestui raport ($A_{260}/A_{280} < 1.6$) indică impurificarea ADN-ului cu proteine. Absorbanta la 230 nm reflectă contaminarea probei cu fenol sau uree, în timp ce absorbanta la 325 nm sugerează contaminarea cu particule și cuve murdare. Pentru ARN-ul pur valoarea optimă a raportului A_{260}/A_{280} este de 2.

Calitatea ADN-ului extras (integritatea ADN-ului) poate fi evaluată și fără cuantificare propriu-zisă prin electroforeză orizontală. Aceasta presupune migrarea probei în gel de agaroză (în sistem submers, orizontal), sub acțiunea unui câmp electric. ADN-ul este vizualizat în lumină UV, datorită fluorescenței dobândite ca urmare a intercalării moleculelor de bromură de etidiu (EtBr) incluse în gel, între bazele azotate.

Stocarea acizilor nucleici. Temperatura de stocare a acizilor nucleici este pe termen scurt (max. 72 de ore) la 2- 8°C; pe termen lung (> 1 săptămână) stocare la -15 la -25°C și nelimitat la -80°C.

Tehnicile pentru diagnostic molecular au de obicei la bază principiul reacției de polimerizare în lanț (PCR).

Metoda PCR (Polymerase Chain Reaction – Reacția de polimerizare în lanț)

Reacția PCR a fost inventată în 1983 de către Kary B. Mullis (pentru care a primit în 1993 Premiul Nobel), cunoscând după anii 1988 o dezvoltare explozivă, revoluționând Biologia Moleculară. Reacția de polimerizare în lanț (PCR) permite amplificarea enzimatică exponențială a unor secvențe scurte de ADN. Aceasta se realizează automat cu ajutorul unor aparate tip termociclor (termocycler). Dezvoltarea tehnicii a avut loc mai ales după descoperirea Taq polimerazei, enzima cheie a reacției PCR, o polimerază stabilă la temperaturi înalte (aproximativ 94°C), la care moleculele de ADN, în mod normal dublu catenare, disociază. Astfel fiecare catenă poate fi copiată, iar reacția poate fi repetată de zeci de ori datorită faptului că enzima rămâne funcțională, în final cantitatea de ADN obținută fiind suficient de mare pentru a fi analizată în laborator. Taq polimeraza este o ADN polimerază termostabilă izolată inițial dintr-o tulpină de *Thermus aquaticus*, o bacterie termofilă izolată din izvoarele termale Yellow Spring din Statele Unite ale Americii. Aceasta a fost izolată de către Thomas D. Brock în 1965.

Metoda PCR este utilă în situațiile în care cantitatea de ADN este limitată (de exemplu în criminalistică, teste prenatale), deoarece amplifică o singură sau câteva copii ale ADN-ului generând milioane de copii ale fragmentului respectiv. Capacitatea de a produce rapid cantități mari de material genetic a permis progrese științifice semnificative, inclusiv pentru secvențierea genomului uman. În prezent, tehnologia PCR este foarte folosită atât în cercetare cât și în diagnosticul și managementul pacientului mai ales în boli virale, cum ar fi infecțiile cu HIV, HPV, CMV, virusurile hepatice. În afara de detectarea organismelor infecțioase, această tehnologie este de asemenea utilă pentru determinarea polimorfismului genetic sau identificarea mutațiilor (diagnosticul unor boli monogenice, boli mitocondriale), în cancere

(fiind tehnica cea mai frecvent utilizată în această patologie), studii de antropologie (analiza unor secvențe ADN din fosile), în diagnosticul prenatal (inclusiv al anomaliilor cromozomiale), în medicina legală (paternitate, criminalistică).

Etapele care se repetă în reacția PCR sunt: denaturarea termică (94-98°C), atașarea primerilor sau amorsoarelor (37-60°C), extensia sau elongarea primerilor (la aproximativ 72°C).

Componentele reacției PCR sunt următoarele:

- *matrița ADN* - de cele mai multe ori se folosește ADNdc (ADN dublu catenar) izolat, care conține fragmentul de interes, care trebuie amplificat. Se recomandă ca, cantitatea de matriță utilizată să reprezinte între 10-15% din volumul amestecului de reacție care va fi folosit.
- *amorse* (primeri) - sunt oligonucleotide de 15-30 bp (optim 18-22 pb) complementare cu cele două capete (5' și, respectiv 3') ale secvenței care flanchează regiunea țintă [fragmentul care va fi amplificat, aceste secvențe fiind denumite primer sens și antisens (forward Fw – este identic cu catena sens și va hibridiza pe catena antisens și reverse Rev – va hibridiza pe catena antisens)]. Se recomandă ca primerii să aibă un conținut de guanină și citozină cuprins între 40 – 60% și să existe o distribuție echilibrată a domeniilor bogate în adenină/timină (A/T) și guanină/citozină (G/C), să nu fie complementari unul cu altul și să aibă Tm (temperatura de topire) cu valori cât mai apropiate. Se recomandă ca să existe minim 3 nucleotide C și/sau G printre ultimele cinci nucleotide ale capătului 3' ale primer-ului favorizând astfel fixarea acestuia pe matriță. Este indicat să nu se utilizeze primeri care au mai mult de patru repetiții dinucleotidice sau mononucleotidice (acestea favorizând apariția erorilor de sinteză).
- *ADN polimerază termostabilă*, de exemplu Taq polimerază (*Thermus aquaticus*, care realizează o reacție de extensie enzimatică deoarece polimeraza adaugă nucleotidele în direcția 5'-3'), cantitatea necesară fiind de aproximativ 0.5U/50μl volum de reacție.
- *dezoxiribonucleozide trifosforilate (=nucleotide trifosforice)* (dNTP, dATP, dGTP, dTTP, dCTP), elemente structurale ale catenelor de ADN nou formate, pe care le adaugă Taq polimeraza. De obicei se folosesc cantități egale din fiecare dNTP, de obicei între 100-2500μM din fiecare dNTP.
- *MgCl₂* influențează atașarea primerilor, denaturarea matriței, precum și activitatea enzimatică a Taq polimerazei. Se recomandă ca, cantitatea de magneziu să fie mai mare decât a primerilor, de obicei între 0,5-2,5mM. Excesul de Mg duce la apariția de produși de amplificare nespecfici sau la o denaturare incompletă, iar deficitul de Mg reduce activitatea Taq polimerazei.
- Se mai poate folosi:
 - albumină serică bovină (BSA), care este un agent care leagă inhibitorii reacției PCR (cel mai frecvent proteine, dar și metale grele), concentrația utilizată fiind de 10-100ug/ml.

- DMSO (1-10%) se poate utiliza în cazul unor fragmente bogate în GC (favorizează denaturarea), care se poate folosi și pentru a diminua riscul apariției produșilor secundari (care apar pe gelul de electroforeză sub forma unor benzi suplimentare diferite de banda generată de fragmentul de interes, și sunt datorati legării nespecifice a primerilor, motiv pentru care se recomandă selecția riguroasă a primerilor).

Etapele reacției PCR sunt:

- Denaturarea inițială este o etapă esențială, care are o durată de câteva minute și se desfășoară la 94-96°C, în această etapă are loc separarea celor două catene ale matriței de ADNdc. Temperaturile mai mici pot duce la denaturarea incompletă a matriței dar și a produșilor PCR, iar temperaturile mai mari pot duce la pierderea activității enzimatice.
- Ciclurile propriu-zise de amplificare, fiecare ciclu fiind format din:
 - denaturare cu o durată de câteva zeci de secunde (în medie 30 secunde), la temperaturi cuprinse între 94-96°C. În cazul unor matrițe bogate în perechi GC timpii de denaturare sunt mai lungi.
 - hibridizarea primerilor (annealing, atașarea primerilor) cu o durată de câteva zeci de secunde la temperaturi cuprinse între 50-65°C, temperatura fiind aleasă în funcție de primeri, de obicei este cu 5°C mai mică decât T_m a primerilor). Trebuie reținut faptul că o temperatură prea scăzută va favoriza atașările nespecifice.
 - extensie (elongare), cu o durată de câteva zeci de secunde (durata depinzând de lungimea fragmentului amplificat) de obicei, la 72°C
 - pentru marea majoritate a reacțiilor PCR sunt suficiente 25-40 de cicluri pentru obținerea unui număr suficient de copii ale fragmentului ADN de interes (țintă).
- Elongarea (extensia finală), cu o durată de câteva minute (5-15 minute), la o temperatură de 72°C.

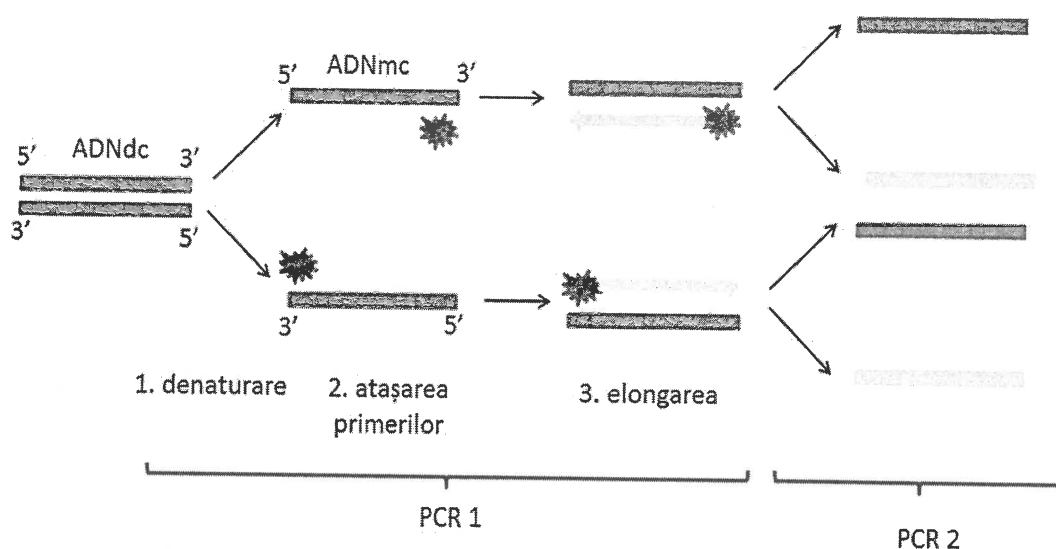


Figura 26.1 Schemă Reacția polimerizării în lanț

Practic tehnica PCR presupune realizarea de cicluri de încălziri și răciri repetate a unui amestec (mix) de reacție, pentru denaturarea ADN-ului și replicarea enzimatică a fragmentului țintă (de interes).

În reacția PCR un rol important îl au primerii (amorzele) și ADN polimeraza. Pe parcursul reacției PCR, fiecare fragment nou format devine matriță pentru următorul ciclu de amplificare, realizându-se o amplificare exponențială a fragmentului ADN de interes.

Verificarea reacției PCR, respectiv detectarea ampliconilor rezultați (fragmente ADN obținute) se realizează prin electroforeză în gel de agaroză, astfel ampliconii rezultați vor migra în câmp electric și vor genera benzi, iar greutatea moleculară a ampliconilor se poate afla prin compararea cu un marker cu greutate moleculară deja cunoscută care migrează în paralel. Aceștia sunt vizualizați cu ajutorul unor sisteme prevăzute cu lampă UV.

Se recomandă ca în orice tehnică PCR să se realizeze și o reacție în care s-a folosit doar mixul de amplificare, fără adăugarea ADN-ului (matriță), numit control de contaminare (no template control, NTC).

Avantajele metodei PCR sunt reprezentate de faptul că este o metodă rapidă, este o tehnică relativ simplă, mai puțin laborioasă decât alte tehnici (de exemplu hibridizarea fluorescentă in situ FISH), costurile sunt reduse, oferă sensibilitate (pot fi detectate secvențe țintă într-un eșantion), oferă specificitate (o secvență specifică de ADN este amplificată prin condiții stricte), de asemenea putem menționa că este o tehnică flexibilă (pot fi identificate secvențe genetice de la diferite microorganisme folosind aceleași condiții de reacție folosite în diagnosticul unor patologii diferite).

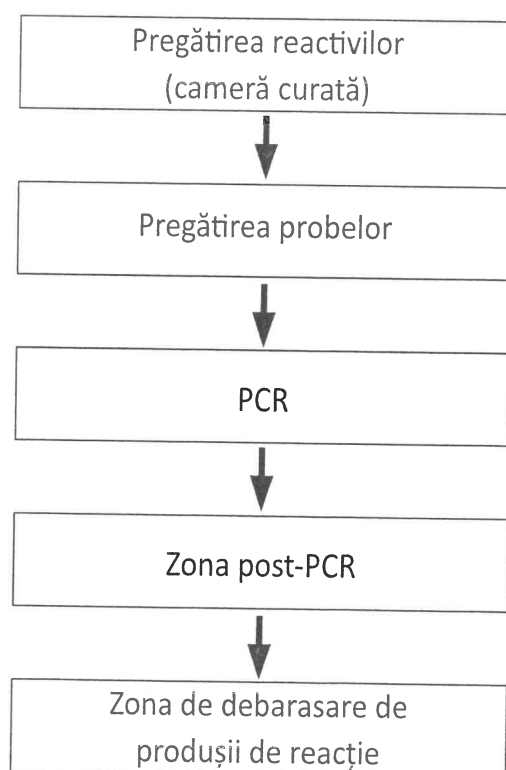


Figura 26.2 Flux de lucru unidirecțional în cazul PCR

Limitele tehnicii PCR sunt: cunoașterea prealabilă a secvenței 3' a fragmentului ADN de analizat (numit și țintă), pentru a permite construcția primerilor; datorită faptului că prin PCR se amplifică cantități extrem de mici de ADN poate apărea contaminarea cu produși proveniți din amplificările anterioare, ampliconi (aceasta putându-se evita prin folosirea unor încăperi dedicate pregătirii amestecurilor de reacții, a unor echipamente dedicate fiecărei arii de lucru, existența unui flux de lucru unidirecțional (figura 26.2), a consumabilelor sterile, suprafețe de lucru curate); ADN polimeraza nu are capacitatea de corectare a erorilor de replicare (sunt încorporate și nucleotide incorecte, aproximativ 1 la fiecare 20.000 pb); mărimea fragmentelor ce pot fi amplificate cu Taq polimeraza este de 2 kb.

Tabelul 26.II Variante ale tehnicii PCR utilizate frecvent în cercetare și diagnostic

Acronim	Denumirea tehnicii
PCR – RFLP	Polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție (Restriction Fragment Length Polymorphism)
ARMS-PCR (ASP)	Detectarea mutațiilor prin amplificare refractară (Amplification Refractory Mutation System – Polymerase Chain Reaction, Allele Specific PCR)
RT-PCR	PCR de revers-transcripție (Reverse transcriptase PCR)
qPCR sau Q-PCR	Real Time PCR, PCR cantitativ în timp real
QF-PCR	(Quantitative Fluorescent PCR)
MLPA	Amplificare cu probe de înaltă specificitate a regiunii de interes (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)
SSCP	Polimorfismul conformațional al monocatenelor (Single Strand Conformational Polymorphism)

Tehnici de diagnostic molecular bazate pe reacția PCR

Tehnica PCR – RFLP (PCR - Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție)

PCR-RFLP este o tehnică moleculară utilizată frecvent în genotipare și se bazează pe o reacție de amplificare (PCR), iar ampliconii obținuți sunt tratați cu enzime de restricție corespunzătoare generând fragmente de restricție de dimensiuni diferite, urmate de separarea acestora prin electroforeză în gel.

Enzimele de restricție sunt endonucleaze bacteriene care acționează la nivelul unor secvențe specifice, scurte, de nucleotide denumite *situsuri de restricție* (4–8 pb) și secționează moleculele de ADN la nivelul situsurilor producând fragmente de diferite lungimi, numite *fragmente de restricție* (polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție RFLP). Polimorfismul ADN-ului apare datorită modificărilor (uneori a unei singure baze azotate - mutații punctiforme) ce se produc în secvența de nucleotide a moleculei de ADN. Mutațiile, prin substituție pot crea un situs de restricție nou sau pot anula un situs de restricție deja existent. Mutațiile, reprezentate de substituții, deleții sau inserții (punctiforme sau de dimensiuni mici), care afectează situsul de restricție vor determina reducerea sau creșterea lungimii

fragmentelor de restricție în care se află, generând polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție (RFLP).

Etapele metodei PCR-RFLP sunt:

- extracția ADN din produsul biologic (cel mai frecvent fiind utilizat sângele periferic);
- amplificarea fragmentului (secvenței) de ADN de interes cu primeri specifici;
- verificarea amplificării prin electroforeză în gelul de agaroză;
- digestia produșilor de amplificare cu enzimele de restricție specifice (enzime de restricție clasice - situație în care sunt necesare mai multe ore sau enzime FastDigest, situație în care digestia se realizează în 5-15 minute);
- separarea fragmentelor de ADN obținute prin digestie prin electroforeză în gelul de agaroză într-un câmp electric;
- vizualizarea produșilor de amplificare în gel de agaroză marcat cu bromură de etidiu (aceasta se intercalează între catenele de ADN facilitând vizualizarea în lumină ultravioletă) sau prin electroforeză capilară;
- interpretarea.

În prezent, există mai multe programe pentru proiectarea de PCR-RFLP în care sunt integrate selecția primerilor și a enzimelor de restricție (de exemplu PIRA-PCR, SNPICKER, SNP Cutter, SNP-RFLPing, Prim-SNPing).

Avantajele metodei sunt reprezentate de faptul că este o tehnică simplă și costurile sunt reduse, se pot folosi pentru analiza polimorfismelor mononucleotidice (SNP), nu necesită un echipament costisitor și un instructaj de durată. Dezavantajele tehnicii sunt reprezentate de faptul că permite doar analiza unor mutații cunoscute, unele enzime de restricție sunt scumpe și tehnica este de durată, nu este potrivită pentru analiza simultană a unui număr mare de SNP-uri diferite datorită necesității utilizării unor primeri specifici și enzime de restricție pentru fiecare SNP. În general, PCR-RFLP este indicată în cazul analizei unui număr redus de probe.

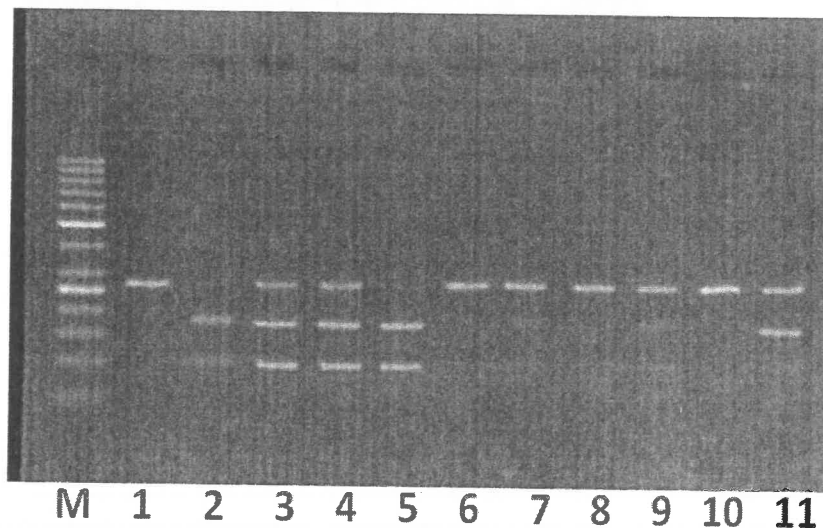


Figura 26.3 Polimorfismul MTHFR C677T (metilentetrahidrofolat reductaza) analizat prin tehnica PCR-RFLP (M- marker de greutate moleculară 50pb, 1,6, 8,10 – homozigotii CC, 3, 4,7, 9, 11 – heterozigotii CT, 2, 5 – homozigotii TT)

Tehnica ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System – Polymerase Chain Reaction, detectarea mutațiilor prin amplificare refractară)

Tehnica ARMS-PCR se bazează pe o amplificarea PCR standard a unui fragment ADN. Pentru realizarea acestei metode se folosesc trei primeri și anume: un primer specific pentru alela normală, unul pentru alela mutantă (aceștia doi diferă doar printr-un singur nucleotid dispus la capătul terminal 3', primer-ul specific alelei normale hibridizând doar cu alela normală, iar cel specific alelei mutante hibridizând doar cu alela mutantă) și un primer comun (acesta hibridizează atât cu alela normală cât și cu cea mutantă). Detectia amplificării la finalul reacției se poate realiza prin electroforeza în gel de agaroză sau prin electroforeză capilară.

Se recomandă ca primerii folosiți pentru ARMS să aibă ≥ 30 de baze și să conțină aproximativ 50% G și C, nu se recomandă utilizarea primerilor cu mai puțin de 28 de baze, design-ul primerilor fiind deosebit de important.

ARMS-PCR este o metodă care necesită două reacții PCR separate și anume (într-un tub mixul de reacție conține primer-ul specific alelei normale și primer-ul comun, iar în celalalt tub mixul de reacție conține primerul specific alelei mutante și primer-ul comun). Ca urmare reacția PCR are loc separat în două tuburi. Prezența produsului PCR confirmă prezența alelei țintă în timp ce absența produsului PCR semnifică absența alelei țintă.

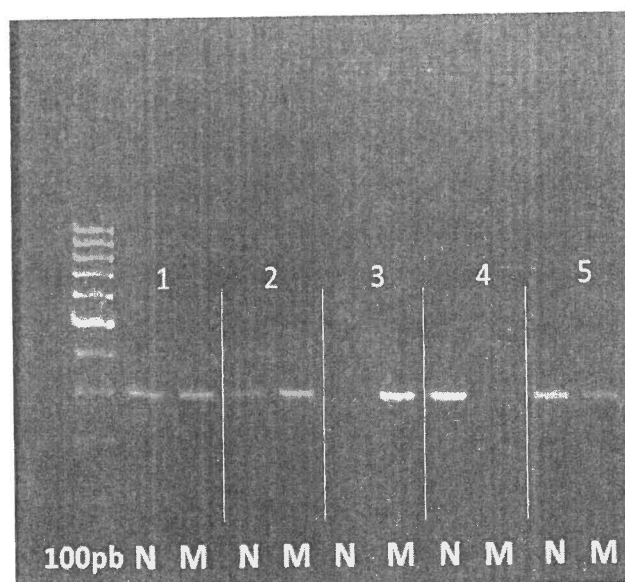


Figura 26.4 Analiza polimorfismului mononucleotidic TNF alfa G308A prin metoda AR-MS-PCR (G-alela normală, reprezentată cu N; A-alela variantă, reprezentată cu M, s-a utilizat un marker de greutate moleculară de 100pb, 1, 2, 5- heterozigoți, 3 – homozigot pentru alela variantă, 4- homozigot pentru alela normală)

Avantajul acestei tehnici este reprezentat de faptul că este o metodă simplă, rapidă și relativ ieftină. Tehnica ARMS-PCR este folosită în mod curent pentru detecția mutațiilor punctiforme cunoscute, deleții sau inserții mici, polimorfisme punctiforme, analiza STR (short tandem repeats). Dezavantajul metodei este reprezentat de faptul că nu dă informații despre alte mutații existente, despre expresia genei, variația numărului de copii ale genei investigate.

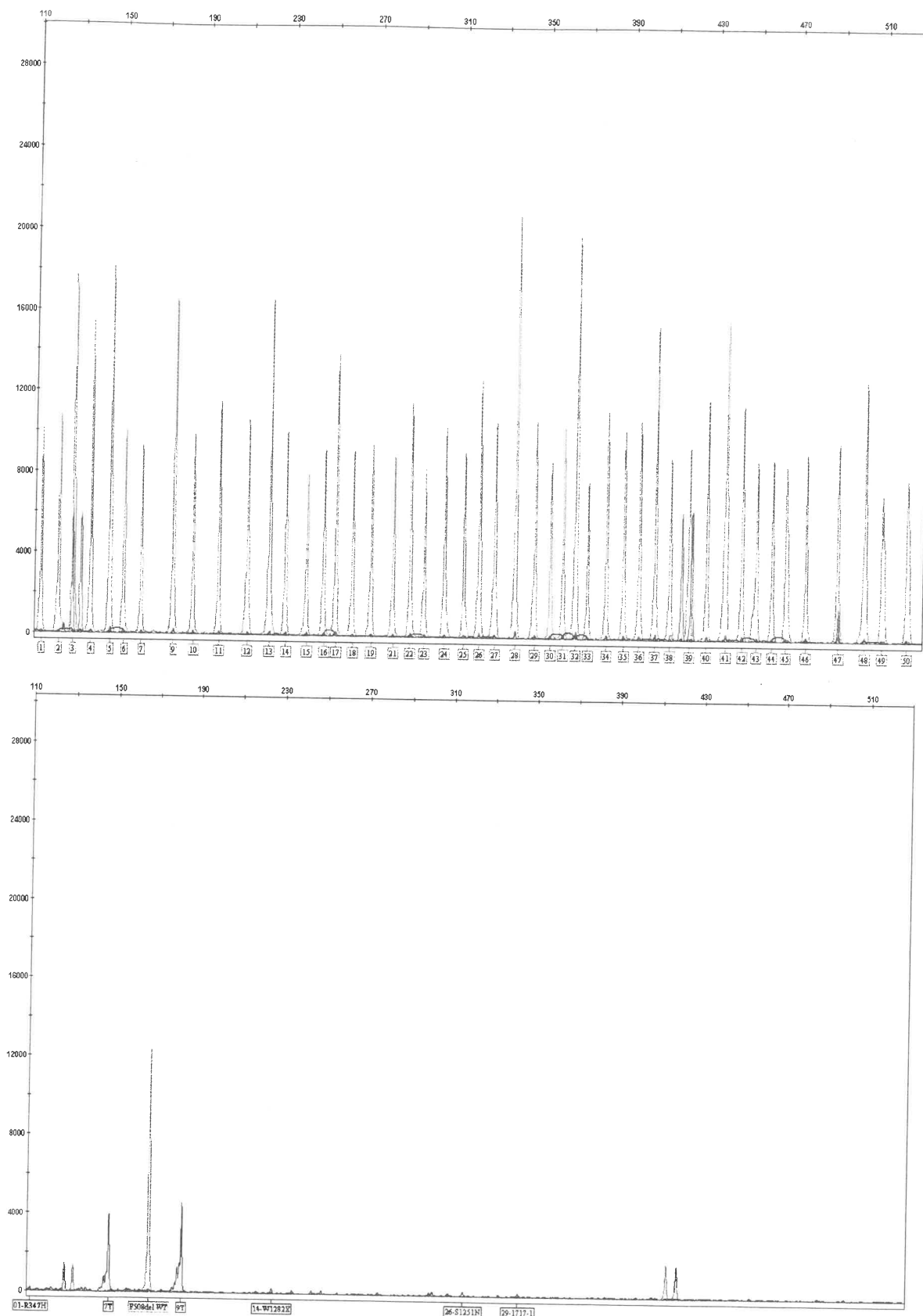


Figura 26.5 Electroforegramă pentru analiza unor mutații în gena CFTR în fibroza chistică prin tehnica ARMS-PCR folosind kitul Elucigene CF-EU2v (sus hibridizare în tubul cu alele normale, jos hibridizare

în tubul cu alele mutante – aici se observă un semnal verde, ceea ce indică alela normală, mutația este indicată printr-un semnal/vârf alabstru). Rezultat normal. Mutații analizate: R347H, R347P, 2789+5G>A, 3120+1G>A, 711+1G>T, R334W, I507del, F508del, 3849+10kbC>T, 1677delTA, 1078delT, V520F, L206W, W1282X, R560T, 2347delG, Q890X, R553X, G551D, S549N, M1101K, G542X, 3905insT, Y1092X (C>A), S1251N, 444delA, 1811+1.6kbA>G, 1717-1G>A, R117H, R117C, N1303K, Y122X, 394delTT, G85E, R1066C, 1898+1G>A, W846X, 2184delA, D1152H, CFTRdel 2,3, P67L, 2143delT, E60X, 3659delC, 3272-26A>G, 621+1G>T, A455E, R1162X, R1158X. Testul detectează și variantele 5T, 7T, 9T ale genei CFTR (IVS8-5T, IVS8-7T, IVS8-9T) și 2 loci STR

PCR de revers-transcripție (Reverse transcriptase PCR, RT-PCR “reverse-transcription PCR”)

Tehnica RT-PCR, este o variantă a PCR. Aceasta este utilă pentru analiza calitativă sau semi-cantitativă a expresiei genice. Într-o primă etapă este necesară obținerea ARN-ului mesager (ARNm) care este reverstrancris în ADN complementar (ADNc) în prezența revers-transcriptazei. ADN-ul complementar (ADNc) va servi ca matriță pentru reacția PCR.

Pentru reverstranscripție (RT-PCR) sunt necesare următoarele:

- o pereche de primeri (se pot folosi primeri: specifici – pentru fragmentul care va fi amplificat, primeri random – care hibridizează la întâmplare, primeri oligodT – care hibridizează pe coada poliadenilică a ARNm);
- revers-transcriptază (ADN polimerază ARN dependentă);
- deoxinucleotide fosforilate (dATP, dGTP, dCTP și dTTP);
- ADN polimerază;
- matriță de ARN.

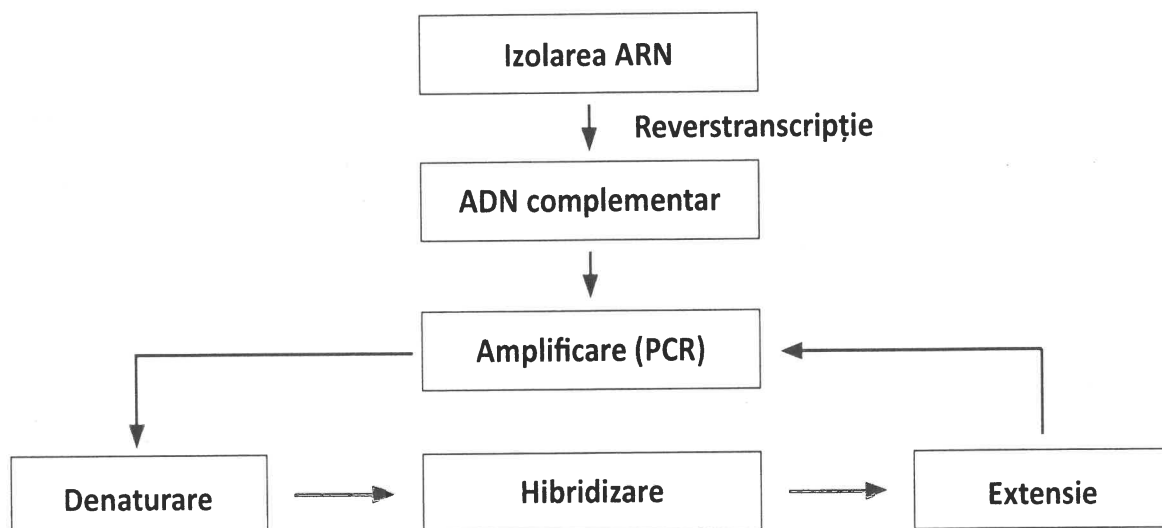


Figura 26.6 Schema pentru RT-PCR

Dezavantajul metodei îl reprezintă faptul că ARN-ul este susceptibil la degradare rapidă la temperatura camerei, sensibil la modificările de pH și la acțiunea ribonucleazelor, motiv pentru care probele recoltate în vederea extracției ARN-ului trebuie prelucrate cât mai rapid posibil (maxim 24 ore). Pentru extracția ARN se folosesc doar probe recoltate folosind ca anticoagulant EDTA. În cazul în care izolarea ADN-ului nu se poate face imediat, probele pot fi înghețate în azot lichid sau se pot folosi soluții de stabilizare a ARN (RNA later sau RNA shield), acestea permițând ca izolarea ARN-ului să poată fi efectuată după câteva zile, săptămâni, sau chiar luni din momentul colectării probelor biologice, fără a afecta integritatea ARN-ului.

Revers-transcrierea și amplificarea (PCR) pot fi efectuate într-un proces care necesită o etapă (one-step RT-PCR) sau două etape (two-step RT-PCR). În general, procesul în două etape este mai sensibil, în timp ce reacțiile cu o singură etapă sunt mai puțin susceptibile la contaminări, deoarece tubul nu este deschis după revers-transcriere.

Tehnologia Real Time PCR sau PCR cantitativ în timp real (qPCR sau Q-PCR “quantitative real time polymerase chain reaction”)

Este o tehnică bazată pe reacția PCR. Este o tehnică cantitativă, folosită în special în cazurile în care se dorește nu doar amplificarea unui fragment ADN ci și cuantificarea acestuia.

PCR cantitativ în timp real (Q-PCR) este cea mai utilizată tehnică de cuantificare a materialului genetic, putându-se vizualiza în timp real producerea de ampliconi, cu ajutorul unor fluorocromi. Se folosesc probe marcate cu un fluorocrom, care eliberează o cantitate de fluorescență proporțională cu, cantitatea de ADN - țintă amplificată. Tehnica Q-PCR se bazează pe colectarea continuă a semnalului fluorescent produs în timpul reacțiilor PCR, de-a lungul unui număr de cicluri de amplificare și transformarea semnalelor fluorescente rezultate în fiecare reacție în valori numerice pentru fiecare probă analizată, acestea generând curbe de amplificare care reflectă cantitatea de produși PCR obținuți, prin raportarea la un standard).

Tehnologia Real-Time PCR a devenit standardul în cuantificarea acizilor nucleici (ADN, ARN), a îmbunătățit și simplificat cuantificarea acizilor nucleici, fiind folosită atât în cercetare cât și în diagnosticul și chiar monitorizarea moleculară în diferite patologii.

Tehnica Real-Time PCR este folosită frecvent în oncologie, hemato-oncologie (pentru monitorizarea clonei tumorale mutante, de exemplu detecția transcriptului BCR-ABL în leucemia mieloidă cronică); în microbiologie (pentru măsurarea încărcăturii bacteriene); în virusologie (pentru măsurarea încărcăturii virale). De asemenea se folosește în studiile de expresie genică (permițând cuantificarea relativă, confirmarea supra- sau sub-expresia unei gene față de un nivel “normal”); în studiul ADN-ului mitocondrial, detecția metilării; discriminarea alelelor; pentru detecția polimorfismelor mononucleotidice sau a SNP-urilor (Single Nucleotide Polymorphism).

Pentru tehnologia Real-Time PCR se acordă o atenție deosebită:

- calității ADN-ului (acesta trebuie să fie pur, fără proteine; să nu fie degradat; să nu conțină inhibitori ai reacției PCR, de exemplu alcool);
- setului de primeri folosiți (aceștia trebuie să fie specifici zonei de interes, să nu formeze dimeri);
- se folosesc următoarele controale:
 - control negativ (fără ADN, denumit “no template control”), putându-se verifica astfel contaminarea amestecului de reacție, a reactivilor folosiți;
 - control pozitiv (folosit pentru a verifica dacă reacția funcționează);
 - control intern (reprezentat de un fragment ADN diferit de ADN țintă cu primeri specifici care se amplifică în paralel cu proba de analizat; amplificarea controlului intern confirmă lipsa inhibitorilor din reacția PCR).

Există mai multe metode de obținere și monitorizarea a fluorescenței de-a lungul reacției de amplificare în cadrul Real-Time PCR:

- metoda specifică, care utilizează sonde de hidroliză care sunt sonde oligonucleotidice complementare față de fragmentul/secvența de ADN de interes. Sondele de tip

TaqMan sunt dublu marcate, adică la capătul 5' cu o substanță fluoroforă "reporter dye" R) iar la celălalt capăt (3') cu o moleculă blocantă ("quencher dye" Q). Cât timp sonda este intactă, fluorescența emisă de „reporter” (R) va fi inhibată de „quencher” Q. În cazul în care amplificarea este eficientă, moleculele de ADN nou formate vor fixa prin hibridizare sonda TaqMan și ADN polimeraza va degrada sonda prin activitatea sa enzimatică (de tip 5' endonucleaza) și va elibera astfel fluoroforul emițând semnalul fluorescent. Avantajele utilizării probelor TaqMan sunt: secvențe specifice, oferă posibilitatea de multiplex (cuantificare comparativă); iar dezavantajele sunt reprezentate de faptul că este greu de optimizat și sunt scumpe.

- metoda nespecifică care utilizează substanțe care se intercalează în moleculele dublu-catenare. Frecvent se folosește marcarea cu SYBR Green, care are următoarele avantaje: ușor de folosit, sunt relative ieftine, indicate în screening. Dezavantajul utilizării SYBR Green este datorat faptului că detectează orice ADNc din reacție.
- metoda care utilizează două secvențe oligonucleotidice: una marcată cu un fluorocrom donor la capătul 3' și cealaltă marcată cu un fluorocrom acceptor la capătul 5'. Probele hibridizează și energia este transferată de la donor la acceptor, printr-un mecanism FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), fluorescența emisă de acceptor putând fi măsurată.

Sensibilitate ridicată a tehnologiei Real-Time PCR face tehnica aplicabilă în cazul cantităților foarte mici de probe, cum ar fi cele obținute prin aspirarea cu ac fin. Instrumentele Real-Time PCR permit simultan amplificarea cât și detecția (cuantificarea), nemaifiind necesară deschiderea tuburilor care conțin produsul de amplificare PCR, reducând astfel riscul de contaminare.

QF-PCR (Quantitative Fluorescent PCR)

Analiza QF-PCR include amplificarea, detectarea și analiza secvențelor cromozomiale specifice (secvențe de ADN) cunoscute sub numele de markeri genetici sau microsateliți (STR). Se folosesc primeri specifici marcați fluorescent pentru amplificarea PCR a markerilor individuali, numărul de copii ale fiecărui marker indică numărul de copii ale cromozomului. Producții PCR rezultați pot fi analizați și cuantificați utilizând un analizor genetic.

O probă diploidă normală conține câte doi cromozomi pentru fiecare pereche. Două alele (corespunzătoare unei perechi cromozomiale) ale unui marker cromozomial specific sunt detectate ca două vârfuri ("peak-uri", semnale) într-un raport de 1:1, când markerul este heterozigot și ca un vârf (semnal) atunci când markerul este homozigot (au alele de aceeași lungime). Detectarea unei alele suplimentare, sub forma a trei vârfuri într-un raport de 1:1:1 sau ca două vârfuri în proporție de 2:1/1:2 indică prezența unei copii suplimentare corespunzând unui cromozom suplimentar (de exemplu în cazul unei trisomii). Subiecții homozigoți sau monosomici pentru un marker specific vor avea doar un singur vârf.

Tehnica QF-PCR este folosită în screeningul rapid al aneuploidiilor, mai ales în diagnosticul prenatal. Microsateliții (STR) localizați pe cromozomii 13, 18, 21 cât și pe X și Y pot fi amplificați simultan prin PCR, astfel putându-se identifica aneuploidiile.

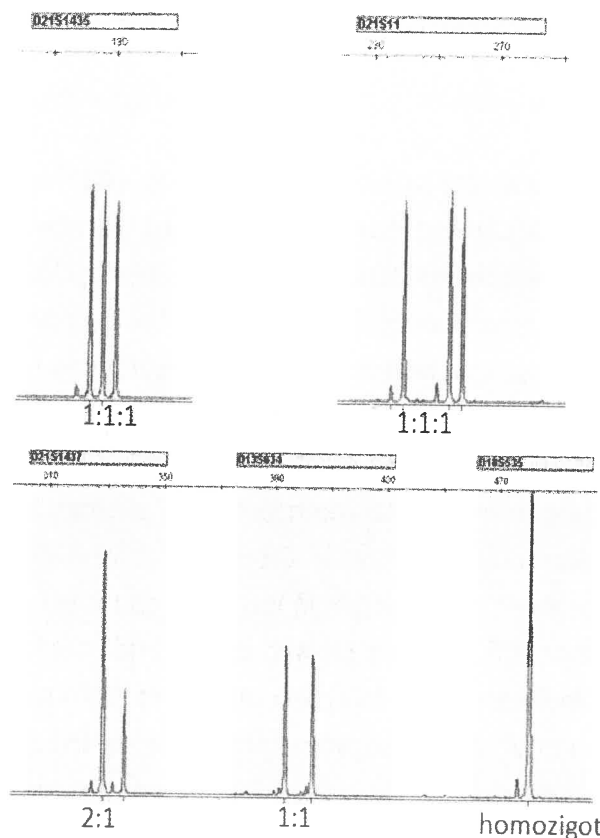


Figura 26.7 Identificarea trisomiei 21 cu ajutorul tehnicii QF-PCR

TaqMan SNP Genotyping (Genotipare prin sistem TaqMan)

Reprezintă o tehnologie extrem de flexibilă pentru detectarea polimorfismelor la nivelul genomului. Se caracterizează printr-un flux de lucru simplu și reprezintă cel mai rapid mod de a genera și obține date privind genotiparea probelor analizate. Metodele de genotipare TaqMan® Assays sunt ideale pentru aplicații de genotipare, inclusiv pentru screening, studii de asociere, etc și se bazează pe discriminare alelică prin Real Time PCR în sistem TaqMan. Este o metodă asemănătoare tehnicii ARMS PCR, dar spre deosebire de aceasta pentru genotiparea prin sistem TaqMan se utilizează sonde de hidroliză.

Etape:

- Realizarea unui amestec: adăugarea probei de analizat + *TaqMan* Master Mix pentru genotipare + SNP Genotyping Assay (specific pentru fiecare SNP) + apă fără DNAză
- Reacția PCR (Termociclor)
- Obținerea și prelucrarea datelor din probele de ADN prin Real Time PCR

Genotipare prin sistem TaqMan este una dintre cele mai utilizate tehnici de identificare a SNP-urilor, a majorității polimorfismelor dar și a mutațiilor. Metoda permite identificarea homozigoților (normal, mutant) și heterozigoților doar pentru mutația analizată.

Dezavantajul metodei este reprezentat de faptul că aceasta nu furnizează informații despre alte mutații existente în gena analizată, despre expresia genei sau variația numărului de copii a genei respective.

La ora actuală se pot comanda testele pentru genotipare prin metoda TaqMan personalizate, adică specifice fiecărui SNP care se dorește a fi analizat.

Nested PCR

Această metodă presupune realizarea a două reacții de amplificare succesive cu scopul de a reduce amplificările nespecifice. Sunt necesare două perechi diferite de primeri pentru a crește specificitatea reacției de amplificare, a doua pereche de primeri flanchează un fragment mai mic din interiorul primului fragment amplificat cu prima pereche de primeri. Cantitatea de ampliconi care se obține este mare datorită celei de a doua runde de amplificare. Dacă se realizează corect (evitarea contaminării încrucișate), această metodă crește atât sensibilitatea cât și specificitatea reacției PCR.

Dezavantajul acestei tehnici este reprezentat de posibilitatea contaminării în timpul transferului primului produs amplificat în tubul în care va fi efectuată a doua amplificare (de aceea se recomandă să nu se deschidă mai mult de un tub la un moment dat). Contaminarea poate fi controlată utilizând primeri care hibridizează la temperaturi diferite. De asemenea se recomandă utilizarea unei zone separate pentru pregătirea probei după prima amplificare, utilizarea unui control negativ suplimentar pentru a doua rundă de amplificare, precum și a unui control negativ din primul PCR în a doua rundă de amplificare pentru a verifica rezultatele fals-pozitive.

primul set de primeri

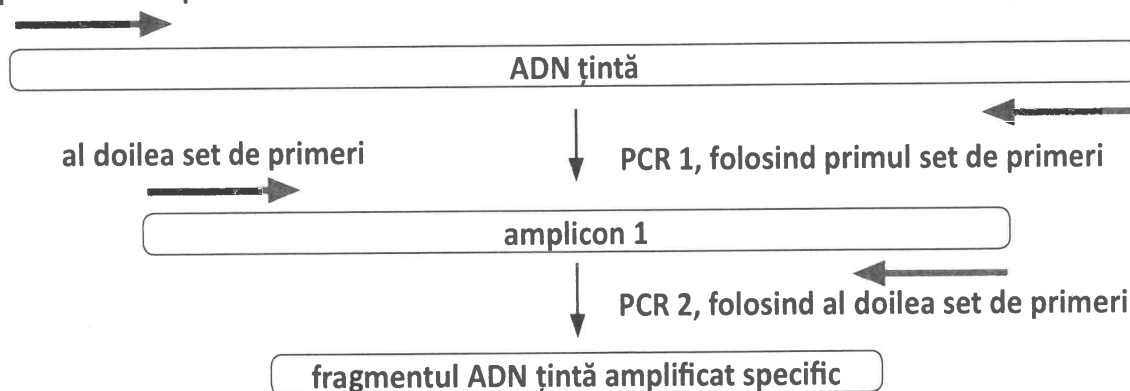


Figura 26.8 Principiul metodei nested PCR

Multiplex-PCR

Tehnica multiplex-PCR constă în amplificarea simultană a mai multor secvențe, folosind seturi diferite de primeri, specifici pentru secvențe diferite de ADN, într-o singură reacție PCR, într-un singur tub, producând ampliconi de dimensiuni diferite. Reprezintă o metodă rapidă pentru identificarea delețiilor sau a duplicațiilor care interesează gene mari. Tehnica a fost

descrișă în 1988, fiind folosită pentru identificarea delețiilor în gena distrofinei (descrise la pacienții cu distrofie musculară Duchenne)

Condiții necesare: seturile de primeri trebuie alese astfel încât acestea să aibă temperatura de topire/melting (T_m) apropiate, segmentele amplificate să aibă dimensiuni diferite (pentru a forma benzi distincte care să fie apoi vizualizate în gelul de agaroză). În cazul reacției multiplex-PCR trebuie acordată o atenție deosebită în alegerea și concentrația primerilor, astfel încât aceștia nu interacționează sau concureze între ei.

Este o metodă rapidă datorită faptului că se fac mai multe analize într-o singură reacție. Fiind o tehnică realizată într-un singur tub se reduce nu doar durata și costurile și riscul de contaminare.



Figura 26.9 Multiplex PCR pentru gena GSTT1 și GSTM1
(marker de greutate moleculară 50pb, β -globina - folosită ca și control intern pozitiv, alela GSTM1=219pb, alela GSTT1=459pb)

Long PCR

Această variantă PCR este utilizată pentru amplificarea unor fragmente de 5 - 40 Kb. Sunt necesare polimeraze care au proprietatea de a sintetiza catene lungi, de multe ori în amestec cu polimeraze cu rată mică de erori de amplificare. Sunt disponibile amestecuri (mixuri) de enzime care conțin Taq Polimeraza și o ADN polimerază termostabilă. Se recomandă de asemenea ca primerii folosiți să aibă secvențe mai lungi (26-36 nucleotide). Amestecul de enzimă se adaugă ultimul pentru a preveni degradarea primerilor. În practică se folosește pentru amplificarea genelor mari.

Hot start PCR (PCR cu start fierbinte)

Este o reacție PCR care folosește o ADN polimerază care nu este activă la temperatura camerei sau la temperaturile de hibridizare a primerilor (ex. Pfu). Este necesară o încălzire inițială a matriței la temperaturi ce produc disocierea catenelor (95-99°C) reducând apariția de produși nespecfici, a dimerilor de primeri.

În cadrul reacției PCR clasice, ADN Taq polimeraza este activă la temperatura camerei și în mai mică măsură, chiar și pe gheață. În unele cazuri, după pregătirea amestecului de reacție, din cauza acestor temperaturi scăzute primerii hibridizează nespecific (dimeri de primeri). Aceștia pot influența Taq polimeraza, generând produși nespecifici scăzând astfel randamentul reacției.

Tehnica MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, amplificare cu sonde de înaltă specificitate a regiunii de interes)

Tehnica MLPA este o metodă moleculară nouă, de înaltă rezoluție, fiind un PCR multiplex care permite detectarea unui număr anormal de copii și anume analiza într-o singură reacție PCR de până la 50 de secvențe diferite de ADN sau ARN, putând distinge secvențe care diferă printr-un singur nucleotid. Spre deosebire de PCR multiplex standard, pentru amplificarea MLPA se folosește o singură pereche de primeri, produșii de amplificare obținuți fiind separați prin electroforeză capilară.

Astfel, pot fi detectate deleții sau duplicații (utile în diferite sindroame de microdeleții, în cancere).

Avantajul principal ale metodei este reprezentat de ușurința folosirii acesteia, permițând detecției delețiilor/ duplicațiilor. Este o tehnică rapidă, rezultatul fiind obținut în aproximativ 24 de ore. Pentru această metodă sunt necesare un termociclor și un sistem de electroforeză capilară. Sunt disponibile peste 300 de seturi de sonde atât pentru boli relativ comune (sindromul Duchenne, DiGeorge, atrofie musculară spinală SMA) dar și pentru boli foarte rare (pancreatită ereditară, deficit de antitrombină, sindromul Birt-Hogg-Dube).

Pentru interpretarea rezultatelor se folosește softul Coffalyser (soft dedicat, disponibil pe site-ul MRC Holland, compania care a inventat această tehnică în 2002) care analizează produșii de reacție obținuți ținând cont de greutatea lor moleculară și expresia cantitativă.

În cazul acestei tehnici de analiză sunt necesare mai multe etape:

- izolarea ADN genomic (ADNg) total din proba biologică,
- denaturarea și hibridizarea sondelor MLPA,
- reacție de ligare urmată de o reacție PCR a hibrizilor rezultați,
- ampliconii obținuți sunt analizați prin electroforeză capilară și apoi are loc detecția în fluorescență a produșilor formați și analiza datelor.

Tehnica MLPA se folosește în diagnosticul prenatal și anume identificarea aneuploidiilor (anomaliile de număr ale cromozomilor 13, 18, 21, X, Y), detecția delețiilor sau duplicațiilor cromozomiale (frecvente în cancere), detecția delețiilor sau duplicațiilor care interesează unul sau mai mulți exoni (distrofia musculară Duchenne), în cancere (detecția anomaliilor genice de tipul în plus sau în minus), identificarea metilării (în sindromul Prader-Willi, Angelman, Beckwith-Wiedemann), detecția mutațiilor punctiforme sau a polimorfismelor mononucleotidice (SNP-uri) și a variației numărului de copii (CNV).

Avantajele aceste metode sunt reprezentate de faptul că este o tehnică cu largă utilizare în domenii diferite, este o tehnică de tip multiplex (ceea ce permite realizarea mai multor

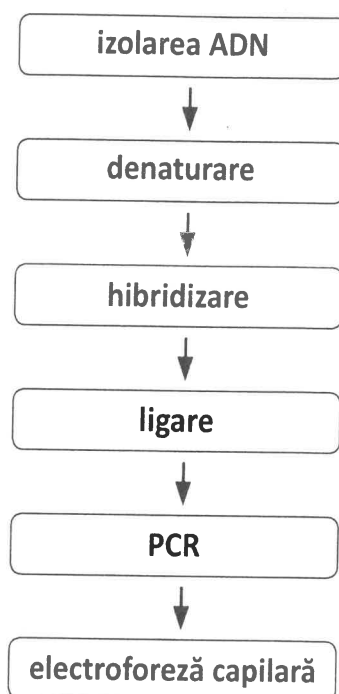


Figura 26.10 Etapele tehnicii MLPA

analize concomitent), costurile sunt mai mici, este relativ rapidă (aproximativ 24 de ore pentru tehnicile MLPA, și 72 de ore pentru tehnicile MS-MLPA), utilizează un singur fluorocrom, permite analiza simultană a mai multor probe, permite analiza unor fragmente de aproximativ 60 nucleotide (fiind astfel utilizată în identificarea delețiilor sau duplicațiilor de la nivelul unui singur exon).

Dezavantajele metodei sunt: este sensibilă la calitatea probei de ADN (nu se recomandă recoltarea probelor pe heparină, necesită minim 20ng ADN) și este mai sensibilă la existența produșilor de contaminare (fenol) față de PCR-ul clasic. Pot fi identificate doar variații a numărului de copii corespunzătoare probelor folosite. Nu se recomandă folosirea acestei metode pentru identificarea mutațiilor necunoscute, pentru analiza unei singure celule.

Tipuri de MLPA

Metoda RT-MLPA (Reverse Transcriptase MLPA) este utilă în caracterizarea expresiei genice, fiind creată special pentru detectarea profilului ARNm. Avantajele acestei metode sunt: procesarea rapidă a numeroase probe într-un format standard PCR cu 96 godeuri, este simplă comparativ cu alte tehnici cum ar fi PCR în timp real și microarray.

Tehnica MS-MLPA (analiza de metilare-MLPA, Methylation-specific MLPA) se bazează pe tehnica MLPA, fiind o metodă semicantitativă folosită pentru cuantificarea numărului de copii și stabilirea gradului de metilare. MS-MLPA este folosită în cazul bolilor cu defecte de amprentare genică (sindromul Prader Willi, Angelman, Beckwith Wiedemann, etc), pentru analiza aberațiilor de metilare în tumori și pentru evidențierea modificărilor epigenetice.

MS-MLPA este frecvent utilizată în analiza tumorilor, și anume pentru a determina inactivarea transcripțională al genelor supresoare tumorale care pot duce la progresia tumorii sau rezistență la chimioterapie.

În MLPA și MS-MLPA, pe parcursul reacției PCR sunt amplificate probele hibridizate la ADN-ul de investigat și nu se amplifică doar proba de ADN. În metodă MS-MLPA după hibridizarea probelor, reacția decurge în două tuburi. O parte a reacției MS-MLPA va fi prelucrată conform etapelor tehnicii MLPA (tubul 1), obținându-se informații despre numărul de copii a fragmentului analizat. Cealaltă parte a reacției MS-MLPA va fi în continuare supusă digestiei cu endonucleaze sensibile la metilare (HhaI) (tubul 2), obținându-se informații privind gradul de metilare.

Când se produce hibridizarea cu un fragment ADN nemetilat, are loc ligarea probelor de metilare specifică care vor fi digerate de HhaI. O probă MS-MLPA digerată nu va genera un semnal ("peak"), deoarece nu poate fi amplificată. În schimb, atunci când fragmentul de analizat este metilat, gruparea metil va împiedica digestia cu HhaI. O probă MS-MLPA nedigerată, poate fi amplificată în timpul reacției PCR, generând un semnal (vârf, "peak") de dimensiuni mai mari. În cazul secvențelor parțial metilate se obține un semnal ("peak") mai mic.

O atenție deosebită trebuie acordată posibilităților de contaminanți: săruri (concentrații mari apar în urm utilizării anumitor kituri de extracție, fenol, etanol, EDTA (concentrația EDTA din proba de sânge să nu depășească 1.5mM, nu se recomandă metodele de concentrare a ADN prin evaporare), Fe, heparina folosită ca și anticoagulant poate altera reacția MS-MLPA.

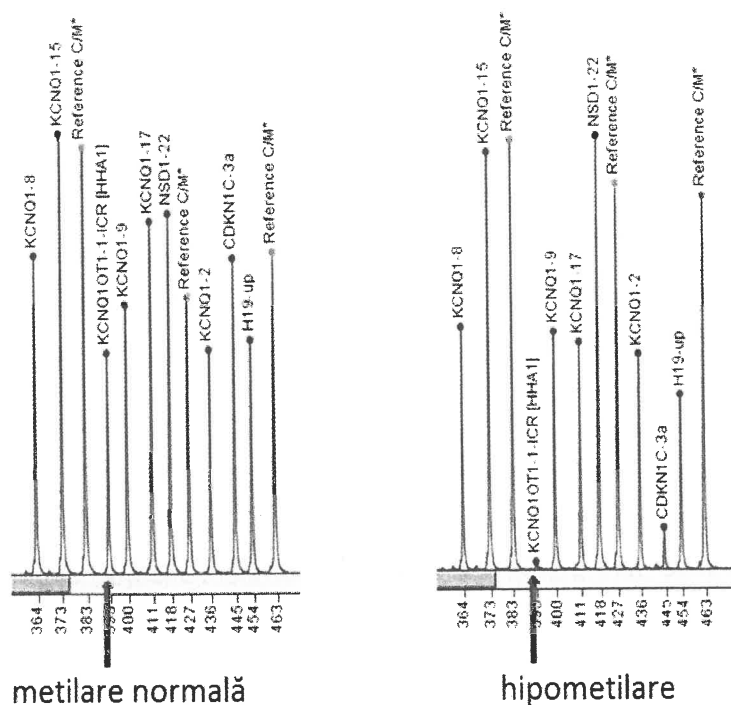


Figura 26.11 Hipometilarea KCNQ1OT1 evidențiată prin tehnica MS-MLPA

Metoda HRM (High resolution melting)

Este o metodă bazată pe analiza post-amplificare PCR a curbelor de topire a fragmentelor ADN amplificate. Este o metodă simplă (utilizează un set de primeri) și rapidă, cu un raport cost-eficiență bun.

Este utilă în detectarea rapidă a mutațiilor genice și polimorfismelor mononucleotidice (SNP), identificarea unor variante genice noi fără să fie necesară secvențierea sau în stabilirea variației genice într-o populație înainte de secvențiere (de exemplu în cazul virusurilor). Este folosită pentru determinarea mutațiilor somatice în anumiți exoni ai unor oncogene (de exemplu *EGFR*, *KRAS*, *PDGFRA*, *KIT*, *BRAF*).

Metoda HRM se bazează pe o reacție de amplificare a secvenței de interes în prezența fluorocromilor care se leagă de ADNdc și emit semnale fluorescente. În cazul în care fluorocromii se leagă de ADNdc emit o fluorescență înaltă, iar în cazul în care nu leagă de ADNdc nu emit fluorescență. După amplificare are loc curba de topire (disociere) la o rezoluție foarte înaltă (HRM), cu pași de temperatură foarte mici (0,1°C) și cu citirea semnalului fluorescent pentru fiecare pas (fenomen detectabil prin analiza fluorescenței în funcție de temperatură), care permite identificarea variației de secvență chiar și cu un singur nucleotid față de o secvență martor. Temperatura de topire (T_m) este temperatura la care 50% din ampliconi sunt disociați. Fluorocromul este eliberat în momentul când are loc denaturarea ADNdc, determinând scăderea fluorescenței. Astfel se obține o curbă de topire ("melting") caracteristică fiecărui amplicon.

Tehnica SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) – Polimorfismul conformațional al monocatenelor

Tehnica SSCP, este utilizată pentru diagnosticul molecular al unor boli genetice și se bazează pe proprietatea ADN-ului monocatenar (ADNmc) de a forma legături de hidrogen intramoleculare adoptând în anumite condiții conformații spațiale diferite. Astfel, conformația moleculelor ADN influențează mobilitatea electroforetică a acestora; astfel încât și moleculele de ADNmc care diferă printr-un singur nucleotid vor migra diferit. Această tehnică se folosește în evidențierea polimorfismului determinat de cel puțin un nucleotid cu ajutorul electroforezei în gel de poliacrilamidă. Acest polimorfism se bazează pe diferențele de conformație ale unei singure catene (mutantă) care diferă de cealaltă catenă printr-un singur nucleotid, datorită unei substituții, deleții sau inserții. Tehnica SSP permite analiza unor fragmente de 150-200pb, rata de detecție a mutațiilor fiind de peste 80%.

Etapele necesare realizării tehnicii SSCP sunt:

- amplificarea PCR, a regiunii de interes,
- denaturarea produșilor PCR,
- electroforeza în vederea separării fragmentelor de ADNmc,
- interpretare, ulterior confirmare prin secvențiere.

Avantajul acestei metode este reprezentat de posibilitatea de a detecta aproape orice mutație. Dezavantajul tehnicii este datorat faptului că nu poate preciza natura mutației. Această metodă poate fi folosită înaintea secvențierii și este utilizată pentru depistarea mutațiilor punctiforme.

Pe parcursul reacției SSCP pot apărea diverse probleme (de exemplu, apariția unor fragmente diferite de ADN în produsul PCR, acestea pot fi datorate unui PCR nespecific, și care

pot fi rezolvate prin optimizarea condițiilor de PCR prin modificarea temperaturii de atașare a primerilor – annealing – și a concentrației de $MgCl_2$).

Tehnica ASO (Allele Specific Oligonucleotide) – Analiza cu sonde oligonucleotidice specifice alelelor

Analiza cu sonde oligonucleotidice specifice alelelor permite identificarea unor mutații specifice (punctiforme) deja cunoscute într-o boală genetică, stabilind existența alelei normale sau patologice în stare de homozigot sau heterozigot la un pacient. De obicei această tehnică se folosește în cazul unor boli rare pentru identificarea alelei mutante și nu în bolile comune.

Pentru realizarea tehnicii ASO se parcurg următoarele etape:

- extracția ADN-ului din produsul biologic; se folosește ADN genomic nefracționat, amplificat în prealabil;
- soluția apoasă cu ADN-ul țintă amplificat (o picătură) se depune sub forma unei pete direct pe o membrană de nitroceluloză (dot-blot) sau indirect printr-o fantă (slot-dot);
- are loc apoi denaturarea ADN-ului și se adăugă o soluție ce conține sonde marcate (probe oligonucleotidice de aproximativ 20 baze marcate radioactiv cu ^{32}P), complementare cu alela normală și cu alela/alelele mutante;
- hibridizarea (între 4-12 ore) sondelor marcate cu proba de ADN provenită de la pacient formându-se heteroduplexuri ADN țintă-sondă;
- vizualizarea heteroduplexurilor formate, respectiv a hibridizării prin autoradiografie.

Avantajele metodei sunt reprezentate de faptul că este mai simplă și mai rapidă, decât metoda Southern blot (folosește ADN genomic nefracționat), permițând totodată și identificarea stării de purtător sănătos heterozigot în cazul mutațiilor recesive. Dezavantajul metodei îl reprezintă marcarea radioactivă a sondelor și faptul că nu permite detectarea altor mutații decât a celei analizate de sonda utilizată. În cazul hibridizării ADN-ului pacientului doar cu sonda specifică alelei mutante pacientul este homozigot pentru alela mutantă (afectat) iar în cazul hibridizării cu ambele sonde (specifică alelei normale și mutante) acesta este heterozigot.

Pentru realizarea tehnicii ASO este necesară cunoașterea secvenței nucleotidice a alelelor normale și patologice, analiza cu sonde oligonucleotidice specifice alelelor fiind utilă mai ales în bolile genetice cauzate de un număr mic de mutații, cunoscute.

Secvențierea ADN

Este metoda care permite stabilirea cu precizie a succesiunii nucleotidelor dintr-o regiune genomică (adică identificarea bazelor azotate în ordinea înlănțuirii lor într-o secvență de ADN), permițând detecția oricărei mutații din structura unei gene, cunoscute sau necunoscute. De-a lungul timpului au fost descrise mai multe metode de identificare a secvenței nucleotidice, și anume: tehnica degradării enzimatică (descrisă de Walter Gilbert în 1977) și tehnica sintezei ADN (descrisă de Frederick Sanger). În prezent secvențierea se bazează pe tehnica descrisă de Sanger.

Etapele necesare secvențierii sunt:

- izolarea ADN (extracția);
- amplificarea fragmentelor ADN;
- verificarea calității amplificării (ampliconii vor fi supuși **migrării** electroforetice în gel de agaroză);
- purificarea ampliconilor (din produsul de PCR sau din gelul de agaroză), necesară pentru eliminarea primerilor neutilizați în reacția PCR **precum** și a compușilor din amestecul de reacție (enzime, dNTP, etc);
- secvențierea propriu-zisă.

Pentru realizarea metodei de secvențiere sunt necesare:

- matrița – se folosesc drept matriță ampliconii purificați **obținuți** prin PCR;
- un primer, (deseori este folosit unul din primerii folosiți și **în** reacția PCR prin care s-au obținut ampliconii);
- Taq polimeraza;
- deoxinucleotide trifosforilate;
- dideoxinucleotide trifosfat, ddNTP (sunt nucleotide modificate, dideoxinucleotidul fiind analog nucleotidic fără grupare –OH în poziția 3'); și **anume** azotate ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP), marcate fiecare cu câte un fluorocrom diferit.

Spre deosebire de reacția PCR, pentru secvențiere este necesar **un** singur primer, obținându-se astfel secvența unei singure catene din molecula de ADN.

Taq-polimeraza adaugă nucleotidele obișnuite, dar, la un moment dat adaugă și un dideoxinucleotid, punct în care elongarea se oprește (prin **împiedicarea** realizării legăturii ester cu următorul nucleotid, Taq-polimeraza nu adaugă deoxinucleotide obișnuite în continuarea unui dideoxinucleotid ddNTP), încorporarea dideoxinucleotidelor este un proces aleator. Fragmentele ADN obținute sunt diferite ca lungime, această variație fiind dată de un singur nucleotid (ultimul nucleotid al acestor fragmente fiind dideoxinucleotidul ddNTP fluorescent corespunzător nucleotidului din matriță). Fragmentele **ADN** astfel obținute sunt migrate electroforetic în capilarul de secvențiere (acesta are la bază **principiul** electroforezei în poliacrilamidă). În timpul migrării, ultimul nucleotid al fiecărui **fragment** este detectat, fiind marcat cu un fluorocrom specific, iar semnalul luminos este **tradus** într-unul grafic, sub forma unei electroferograme.

Complexitatea strategiei de secvențiere depinde de mai mulți **factori**, dintre care cel mai important fiind lungimea fragmentului care trebuie secvențiat.

Avantajele secvențierii sunt: este o metodă automatizată, este **singura** metodă care poate identifica mutații necunoscute (reușind să le și definească); poate **identifica** deleții, inserții, duplicații, inversii existente în fragmentul analizat; permite **verificarea** rezultatelor obținute prin alte tehnici de genetică moleculară, este utilă în situațiile în care există heterogenitate alelică și/sau de locus (situație frecventă în bolile genetice); **permite** o analiză rapidă și sigură. Totodată permite realizarea metodelor ASO și PCR prin sinteza de sonde și amorse.

Dezavantajele: necesită aparate și reactivi speciali, care sunt costisitoare. Metoda nu dă informații despre: alte mutații existente în alte gene (furnizează informații doar despre fragmentele secvențiate); despre expresia genei, variația numărului de copii a genei respective.

Secvențierea are importanță deosebită atât în cercetare cât și în științele aplicate în domeniul biologiei; permite cunoașterea secvenței genomice la specii foarte diferite; în practica medicală, tehnicile de secvențiere sunt folosite în diagnosticul molecular în boli genetice sau infecțioase.

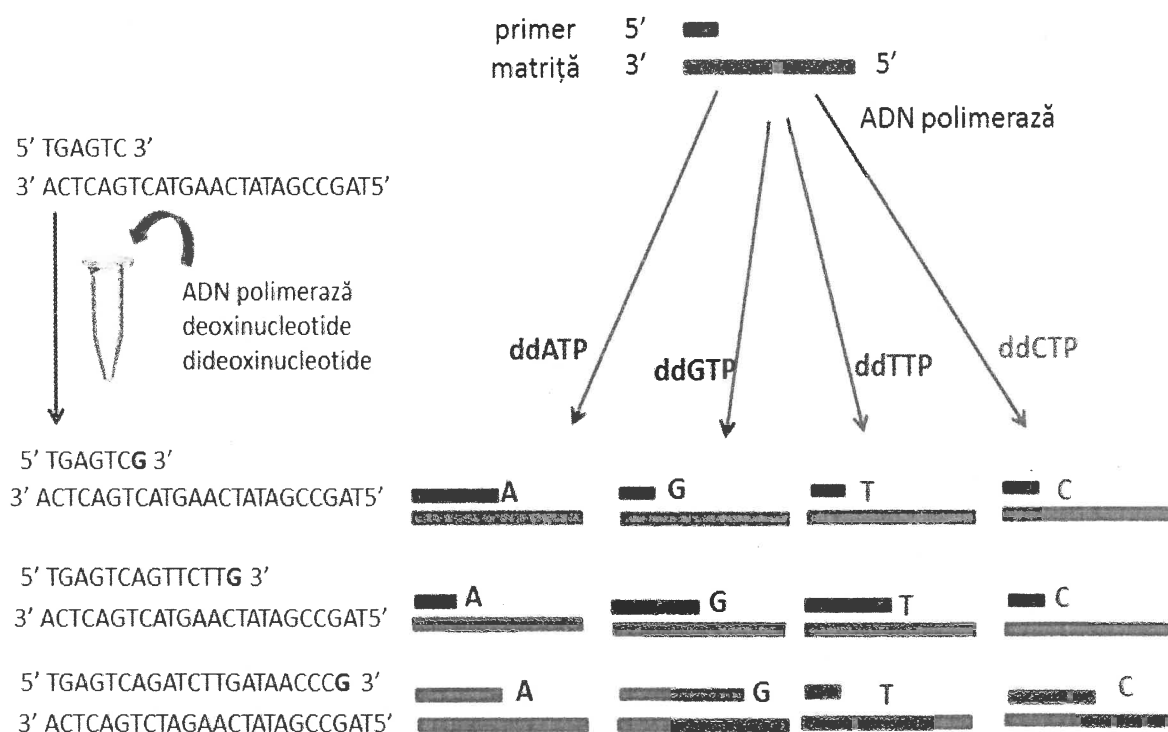


Figura 26.12 Principiul secvențierii

Secvențierea de nouă generație (NGS – Next Generation Sequencing), este cea mai recentă metodă de diagnostic molecular, care permite procesarea unei cantități mai mari de informații, într-un timp mult mai scurt, prin analiza simultană a sute de gene. Permite analiza a sute de mutații într-o singură reacție de tip multiplex. Aceste sisteme permit secvențierea întregului genom (întregul genom uman putând fi analizat într-un singur experiment), epigenom, a exomului uman, a transcriptomului, a genomului mitocondrial, a moleculelor mici de ARN. Astfel a fost posibilă identificarea mutațiilor apărute la pacienții cu leucemie acută mieloidă (LAM) utilizând secvențierea de nouă generație.

Platformele NGS (Illumina, Life Technologies, Beckman Coulter) realizează secvențierea paralelă masivă (datorită faptului că realizează fragmentarea genomului în fragmente mici), implicând realizarea unui număr foarte mare de reacții de secvențiere distincte (mii, sute de mii de reacții, uneori milioane de reacții). Aceste metode generează o cantitate imensă de date (50-120Gb).

Etape necesare:

- îmbogățirea regiunilor țintă din materialul biologic (cel mai frecvent se realizează îmbogățirea exomului, a tuturor secvențelor codante), pentru această etapă este necesară o fragmentare a ADN-ului genomic în fragmente de aproximativ 500pb, care vor fi amplificate prin PCR, obținându-se astfel un număr mare de copii ale fragmentelor de interes (țintă),
- realizarea bibliotecilor de secvențiere pentru fiecare probă (fragmente foarte mici de ADN care vor fi secvențiate prin reacții paralele),
- amplificare,
- secvențiere,
- analiza datelor (secvențele obținute trebuie comparate cu secvențe de referință, cu baze de date, de asemenea sunt comparate între ele),
- validarea datelor obținute (prin intermediul unei alte metode, secvențiere Sanger).

Avantajele acestei metode sunt: este mai ieftină și mai rapidă comparativ cu secvențierea Sanger (durată de câteva ore comparativ cu secvențierea Sanger care ar necesita peste 2 zile), prezintă o sensibilitate crescută pentru detectarea mutațiilor, a fost descrisă ca fiind și o metodă cantitativă, necesită cantități mici de ADN (minim 10 ng).

La ora actuală există paneluri specifice unor patologii diferite care permit analiza mai multor gene:

- panel pentru analiza genelor *BRCA1* și *BRCA2* în cancerul mamar,
- panel care permite analiza unor gene specifice pentru cancerul de colon și cancerul pulmonar,
- panel pentru gena supresoare tumorală *TP53*,
- panel pentru demență care permite analiza a 17 gene – *PRNP, PSEN1, PSEN2, APP, GRN, MAPT, TREM2, CHMP2B, CSF1R, FUS, ITM2B, NOTCH3, SERPIN1, TARDBP, TYROBP, VCP, SQSTM1*
- panelul pentru afecțiuni cardiace, și anume cardiomiopatii, canalopatii, aritmii, anomalii cardiace structurale,
- panel pentru analiza genei *CFTR* în fibroza chistică,
- panel pentru analiza transcriptomului,
- panel pentru analiza ARN (de tip “ready-to-use” pentru cancer și apoptoză), validate prin tehnologia TaqMan
- panel pentru analiza exomului (de tip “ready-to-use”).

Tehnologia NGS permite și identificarea mutațiilor punctiforme, a delețiilor, inserțiilor, inversiilor, se poate utiliza pentru analiza SNP-urilor, identificarea stării de heterozigot, secvențiere ChIP (imunoprecipitare cromatinei, “chromatine immunoprecipitation” indicând astfel secvențele unde se leagă proteinele), analiza metilării (utilă în studiile de epigenetică, în boli produse prin defecte de amprentare sindromul Prader Wili, Angelman, Beckwith-Wiedemann).

În timp ce secvențierea de nouă generație (NGS) este din ce în ce mai populară, secvențierea automată Sanger pare a fi în prezent tehnica cea mai utilizată pentru analiza a multor

boli genetice în laboratoarele de diagnostic molecular clinic (clinical molecular diagnostic laboratories).

Tehnologia microrețelelor (microarray)

Principiul tehnicii microarray se bazează pe complementaritatea bazelor azotate și pe hibridizarea moleculară dintre două fragmente complementare de ADN. Reprezintă o tehnologie multiplex care a permis progrese extraordinare în medicina genomică, fiind utilizată și în studiile de biologie moleculară.

Tehnica constă în utilizarea unor spoturi (în care se află secvențe de ADN cu o secvență bine cunoscută, numite și sonde), care sunt hibridizate cu ADNc (ținta), în condiții foarte bine definite. ADNc este sintetizat prin reverstranscripție de pe ARNm extras din proba de interes (de obicei de la pacient), este marcat cu un fluorocrom și hibridizat pe suprafața "microarray"-ului. Complexele sondă-țintă formate pot fi vizualizate și cuantificate pe baza detecției unui semnal fluorescent (fluorocrom atașat țintei) în vederea cuantificării relative a cantității acizilor nucleici existenți în proba țintă. Cuantificarea nivelului de expresie se datorează faptului că intensitatea semnalului fluorescent al fiecărui spot este direct proporțională cu cantitatea de ARNm prezentă în proba analizată și care a hibridizat cu sonda din spotul respectiv.

Tehnica ADN microarray poate fi utilizată în: analiza expresiei genice (măsurarea nivelului de expresie genică pe baza ADNc); detectarea polimorfismelor mononucleotidice (single nucleotide polymorphisms SNPs); a variațiilor numărului de copii (CNV- copy number variations), detecția genelor de fuziune; detectarea ADN-ului (analiza genomică prin tehnica microrețelei CGH sau hibridizare genomică comparată CGH sau „cariotip molecular”) sau ARN (detectat ca ADNc după revers-transcripție). De asemenea se folosește pentru evidențierea aberațiilor de metilare, a matisării alternative dar și pentru detectarea agenților de mediu (de exemplu aplicații toxicologice de mediu cum ar fi detectarea microbilor în apa contaminată, identificarea agenților patogeni în alimentele prelucrate, monitorizarea alterării produselor alimentare și medicamentoși), farmacogenetică (expresia genică ca răspuns la tratamente medicamentoase noi, identificare de noi ținte moleculare pentru intervenții terapeutice). Tehnologia microarray se folosește mai ales pentru evaluarea expresiei genice (profilul de expresie a unui mare număr de gene, analiza simultană a mii de gene) datorită eficienței, costului și a protocoalelor standardizate. Tehnologia "microarray" permite și studiul proteinelor (protein microarray).

În practică se folosesc frecvent biocipurile, care sunt microcipuri (bazate pe microrețele "microarray") și reprezintă o colecție de spoturi ADN microscopice fixate pe un suport solid (filtru de nylon, nitroceluloză sau lamă microscopică de sticlă; de exemplu cele produse de Agilent, Affymetrics) sau pe micro-sfere (produse de Illumina). Datorită utilizării microrețelelor în cercetarea biomedicală, "microarray"-urile au evoluat de la array-uri bazate pe membrane cu densitate joasă la cipuri de siliciu cu mare densitate.

Etapele necesare analizei microrețelelor (de exemplu array CGH) sunt:

- Alegerea chipului "microarray" în funcție de patologia investigată, rezoluția pe care dorim să o obținem, și de scop (analiza SNP, CNV, etc), sau comandarea unor chipuri cu un "design" specific,
- Izolarea ARN-ului urmată de obținerea ADN complementar ADNc sau izolarea directă a ADN (se va verifica puritatea și integritatea acestuia)
- marcarea ADN-ului /ADNc obținut, markerii fluorescenți folosiți sunt: Cy3 (cianin 3), corespunzător spectrului cu lumină verde și Cy5 (cianin 5) corespunzător spectrului cu lumină roșie,
- Hibridizarea, cea mai importantă etapă, se realizează cu două probe de ADNc care vor fi comparate (se pot folosi probe de pacient/persoană sănătoasă (de referință); celule tratate/celule netratate) marcate cu doi fluorocromi diferiți,
- ADN-ul de la persoane sănătoase/ de referință sunt disponibile de la firmele producătoare (acestea având avantajul purității și integrității) sau se pot prepara în laborator.
- Cele două tipuri de probe marcate cu cianin (Cy-labelled cDNA) sunt amestecate și hibridizate pe același biocip (microcip microarray) care ulterior va fi scanat pentru a analiza intensitatea semnalului fluorescent a celor doi fluorocromi,
- Analiza se realizează cu ajutorul unor programe speciale care includ o interpretare bioinformatică complexă.
- Identificării expresiei genelor (supraexpresie/up-regulated sau inhibată/down-regulated) în urma analizei intensităților relative ale semnalului fluorescent a celor doi markeri. Pentru interpretare este necesară consultarea bazelor de date dedicate diferitelor patologii investigate.
- Validarea rezultatelor, se poate face cu ajutorul tehnici de hibridizare fluorescentă in situ (FISH) în cazul delețiilor sau duplicațiilor, real time PCR, secvențiere în cazul polimorfismelor mononucleotidice, etc

Tehnologia microrețelelor ADN permite analiza simultană a sute de mii de molecule ADN sau ARN și evaluarea profilului structural genomic (determinarea a milioane de „puncte specifice” din genom) sau a profilului de expresie a genelor la scară genomică (și nu „genă cu genă”). Tehnica microrețelelor ADN este utilă în practica medicală, fiind indicată atât în bolile monogenice rare, cât și în bolile comune complexe.

Dezavantajele metodei sunt în primul rând legate de dificultatea interpretării, costurile mari, în cazul array CGH nu se pot identifica anomaliile structurale (cu excepția delețiilor, duplicațiilor).

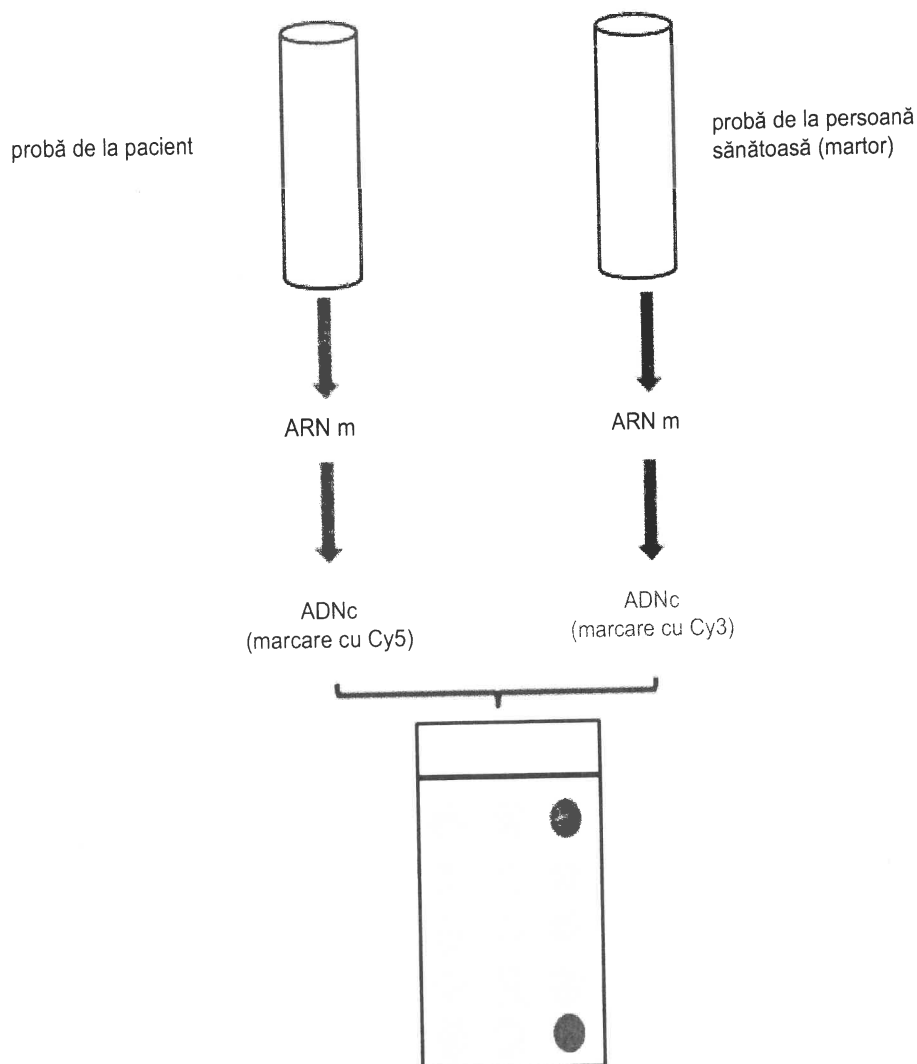


Figura 26.13 Tehnica microrețelelor (array CGH) (probele marcate sunt hibridizate). Semnalul galben indică prezența unui număr identic de copii al regiunii respective la pacient și martor; semnalul verde indică o duplicație a regiunii respective la pacient, iar semnalul roșu indică o deleție.

Bibliografie selectivă

1. Coriu D, Jardan D, Jardan C, Tălmaci R, Dragomir M, Coliță A. A new assay to identify recurrent mutations in acute myeloid leukemia using next-generation sequencing. *Rev Romana Med Lab.* 2014;22(1):93-9.
2. Covic M, Ștefănescu DT, Sandovici I. Genetică medicală, ediția a II-a, Editura Polirom, 2011, 155-167.
3. Covic M. Despre medicina genomică, în Camera Lorzilor. *Viața medicală*, 2012, 13 (1159).
4. Csep K, Bănescu C, Todoran Butilă A. Genomica nutrițională – aspecte practice. Editura University Press, Tîrgu Mureș, 2013, 20-45.
5. Csep K. Extracția și cuantificarea de ADN. Rusu C. Metode uzuale în screeningul și diagnosticul bolilor genetice – Tehnici folosite în genetica medicală. Edit. "Grigore T. Popa, U.M.F. Iași", 2007, 135-140
6. Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Morton CC, Rosenzweig A, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR. Short protocols in human genetics. Wiley, 2006, 7-6, 7-8, 9-38, A3-8.
7. Grada A, Weinbrecht K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *Journal of*

- Investigative Dermatology, 2013, 133, e11;
8. Hernandez-Rodriguez P, Ramirez GA. Polymerase Chain Reaction: Types, Utilities and Limitations, Ed Hernandez-Rodriguez P, Polymerase Chain Reaction, InTech, 2012, DOI: 10.5772/37450. Available from: <http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/polymerase-chain-reaction-types-utilities-and-limitations>
 9. https://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_wI2zCji-rCGANQgZPuTixtCplCA1mmwJoFo_xHPnTgc.
 10. Lewis R. Human genetics: concepts and applications. 9th edition. McGraw-Hill New-York, 2010, 378-394.
 11. Naeim F, Nagesh Rao P, Grody WW. Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches Hardcover – Academic Press, 2008, 65-79.
 12. Passarge E. Color atlas of Genetics. Ed Thieme Verlag, 2007, 60-80.
 13. Pop IV. Genetică medicală. Îndrumător de lucrări practice pentru studenții anului II Facultatea de Medicină Dentară. Editura Medicală Universitară Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, 2012, 136-145.
 14. Popp R, Trifa AP. Metode de analiză moleculară a genelor- analiza mutațiilor genice. Secvențierea ADN, Alte tehnici de diagnostic molecular. sub red Pop IV. Genetică medicală. Îndrumător de lucrări practice facultatea de medicină, Ed. Universitatea de medicină și farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, 2012, 58-66.
 15. Popp R, Trifa AP. Metode de analiză moleculară a genelor- extracția ADN. Reacția PCR. Tehnicile de analiză a mutațiilor genice cunoscute. .sub red Pop Iv. Genetică medicală. Îndrumător de lucrări practice facultatea de medicină, ed. Universitatea de medicină și farmacie Iuliu Hațieganu cluj Napoca, 2012, 47-57.
 16. Rasmussen HB. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting, Ed Magdeldin S, Gel Electrophoresis - Principles and Basics, InTech, 2012, DOI: 10.5772/37724. Available from: <http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/restriction-fragment-length-polymorphism-analysis-of-pcr-amplified-fragments-pcr-rflp-and-related-te>
 17. Rusu C. MLPA și MAPH. Metode uzuale în screeningul și diagnosticul bolilor genetice – Tehnici folosite în genetica medicală. Edit. "Grigore T. Popa, U.M.F. Iași", 2007. 167-176.
 18. Seifi M, Ghasemi A, Heidarzadeh S, Khosravi M, Namipashaki A, Soofiany VM, Khosroshahi AA, Danaei N. Overview of Real-Time PCR Principles, Ed. Hernandez-Rodriguez P, Polymerase Chain Reaction, InTech, 2012, DOI: 10.5772/39220. Available from: <http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/overview-of-real-time-pcr-principles>
 19. Sireteanu A. Hibridizarea genomică comparativă cu microcipuri ADN (array CGH). Analiza mutațiilor AND folosind sonde oligonucleotidice specific unei allele. Metode uzuale în screeningul și diagnosticul bolilor genetice – Tehnici folosite în genetica medicală. Edit. "Grigore T. Popa, U.M.F. Iași", 2007. 177-190.
 20. Skrypnyk C. Polimorfismul mononucleotidic (SNP). Metode uzuale în screeningul și diagnosticul bolilor genetice – Tehnici folosite în genetica medicală. Edit. "Grigore T. Popa", U.M.F. Iași, 2007, 215-224.
 21. Skrypnyk C, Rusu C. Reacția PCR. Metode uzuale în screeningul și diagnosticul bolilor genetice – Tehnici

- folosite în genetica medicală. Edit. "Grigore T. Popa", U.M.F. Iași, 2007, 141-154.
22. Viana RV, Wallis CL. Good Clinical Laboratory Practice (GCLP) for Molecular Based Tests Used, Akyar I (Ed.), Diagnostic Laboratories, Wide Spectra of Quality Control, InTech, 2011, ISBN: 978-953-307-683-6, DOI: 10.5772/23963. Available from: <http://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/good-clinical-laboratory-practice-gclp-for-molecular-based-tests-used-in-diagnostic-laboratories>
23. von Känel T, Huber AR. DNA methylation analysis. Swiss Med Wkly. 2013;143:w13799, doi:10.4414/smww.2013.13799
24. Zugun-Eloae F, Ivanov IC. Tehnici amplificative (PCR) și nonamplificative (Hibridizare in situ) de analiză a acizilor nucleici în diagnosticul molecular. Ed "Grigore T. Popa" 2013, 29-91.

Anexa 1

Abrevieri

17-CS = 17 cetosteroizi	APUD = <i>amine precursor uptake and decarboxylation</i>
2,3-DPG = 2,3-difosfoglicerat	Arg = arginina
5 HTA = Serotonina = 5 hidroxi-triptamina	ARN = acid ribonucleic
5-HIAA = acid 5-hidroxi indolacetic	ARNm = ARN mesager
α 1 AT = alfa 1 antitripsina	ARNr = ARN ribozomal
α 2 Mg = alfa 2 macroglobulina	ARNt = ARN de transfer
Aa = aminoacizi	AST = GOT = aspartat transaminaza, glutamico-oxalacetic transaminaza
Ac ~ S CoA = acetil coenzima A	AT = angiotensină
ACP = proteina de transport / transfer a grupărilor acil	AT III = antitrombina III
ACTH = hormon adrenocorticotrop	ATP = adenzin trifosfat
ADA = <i>American Diabetes Association</i>	AVM = acid vanilmandelic
ADH = <i>antidiuretic hormone</i> – vasopresina	β TG = β tromboglobulina
ADN = acid dezoxiribonucleic	β 2 mg = beta-2-microglobulina
ADNc = ADN complementar	β HCG = fracțiunea β a hormonului coriogonadotropic uman
ADNdc = ADN dublu catenar	BER = reparare prin excizie de baze (azotate) - <i>Base Excision Repair</i>
ADNg = ADN genomic	Bi = bilirubină
ADP = adenzin difosfat	BK = bradikinină
AFP = alfa fetoproteina	BMR = boala minimă reziduală
AG = acizi grași	Ca = calciu total
AINS = antinfamatoare nonsteroidiene	Ca ²⁺ = calciu ionic
Ala = alanina	CDC = <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Atlanta)
ALT = GPT = alanin transaminaza, glutamico-piruvico transaminaza	CEA = antigenul carcinoembrionar
AMP = adenzin monofosfat	CGH = <i>Comparative genomic hybridization</i>
AMPc = Adenzinmonofosfat ciclic	Ch = chilomicroni
ANP = <i>atrial natriuretic peptide</i> – peptidul natriuretic atrial	CIC = complexe imune circulante
ApoP = apoproteine	

Cit = citocrom

CK = CPK = creatinfosfat kinază

Cl = clor

CLIP = *corticotropin-like intermediary peptide* – peptidul similar corticotropinei, provenit din lobul intermediar

CMH = complex major de histocompatibilitate

CMP = citidin monofosfat

CO₂ = dioxid de carbon

CRH = *corticotropin releasing hormone* – corticoliberină

CSR = corticosuprarenala

Cu = cupru

DAG = diacilglicerol

dAMP = deoxiadenozin monofosfat

dCMP = deoxicitidin monofosfat

DDAVP = Dezaminodextroargininasopresină

dGMP = deoxiguanozin monofosfat

DHEA = dehidroepiandrosteron

DHEAS = dehidroepiandrosteron sulfat

DI = diabet insipid

DIT = diiodtirozină

DMSO = dimetil sulfoxid

DOPA = dihidroxi fenil alanina

dTMP = deoxitimidin monofosfat

DZ = diabet zaharat

EDRF = *endothelial derived relaxing factor*

EDTA = etilen diamino tetra acetat

EGF = *epidermal growth factor*

EIA = *enzymatic immunoassay*

ELAM = endothelial leucocyte adhesion molecule

ELISA = *enzyme-linked immunosorbent assay*

F Alc = FAL = fosfatază alcalină

FAH = fenilalanin hidroxilază

FDA = Food and Drug Administration

FGF 1-7 = factori de creștere ai fibroblaștilor 1-7

FIA = *fluorescent immunoassay*

FISH = hibridizare fluorescentă in situ

FN = fibronectina

FRET = *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

FSH = hormonul foliculostimulator

G = glucoză

Gal = galactoză

GGT = γ GT = γ glutamil transpeptidază

GH = hormonul de creștere

GH-R = receptorului pentru GH

GHBP = *GH-binding proteins* – proteine care leagă GH

GHRH = *growth hormone releasing hormone* - somatoliberină

GHRP = *growth hormone releasing peptides* – peptide care determină eliberarea GH

GIP = *gastric inhibitory polypeptide* – polipeptidul inhibitor gastric

Gln = glutamină

Glu = acid glutamic

GLUT = transportor de glucoză

GM = greutate moleculară

GMP = guanozin monofosfat

Gn = glicogen

GnRH = hormonul eliberator de gonadotropină

GTP = guanozin trifosfat

GWAS = *genom-wide association studies*

H₂ = hidrogen gazos

H₂CO₃ = acid carbonic

Hb = hemoglobină

HbA1c = hemoglobină glicozilată, fracțiunea 1c

hCG = HCG = *human chorionic gonadotropin* - gonadotropina corionică umană

HCl = acid clorhidric

HCO₃ = bicarbonat

HDL = *high density lipoproteins* – LP cu densitate mare

HER-2 = receptorul pentru factorul de creștere epidermic

His = histidină

HIV = virusul imunodeficienței umane

HLA -A, -B, -C = antigene leucocitare umane A, B, C

HMG CoA = hidroximetilglutaril Coenzima A

HMWK = *high molecular weight kininogen* – kininogen

gen cu masă moleculară mare	MCF = microscopie în contrast de fază
HPL = <i>human placental lactogen</i>	MCH = media hemoglobinei corpusculare
HPLC = cromatografia lichidă de înaltă presiune/ performanță	MCV = volumul mediu eritrocitar
HRM = <i>high resolution melting</i>	MEN = Neoplaziile endocrine multiple
HSP = Hsp = <i>heat-shock proteins</i> – proteine de șoc termic	Mg = magneziu
HVA = Acid Homovanilinic	Mg ²⁺ = magneziu ionic
i.m. = intramuscular	MGG = May-Grünwald-Giemsa
i.v. = intravenos	MIT = monoiodtirozină
IDDM = diabet zaharat insulino-dependent	MLP = microscopie în lumină polarizată
IFN-γ = interferon γ	MLPA = <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Am- plification</i>
Ig G, A, M = imunoglobuline G, A, M	MO = microscopie optică
IGF = <i>insulin-like growth factors</i> – factor de creștere asemănător insulinei	MMR = mecanisme de reparare a erorilor de împe- rechere („ <i>mismatch repair</i> ”)
IL = interleukină	MSH = hormonul melanocitostimulator
IL-1 = interleukina 1	Na = sodiu = natriu
IL-6 = interleukina 6	NANA = acid N-acetil neuraminic
IP3 = inozitol 1,4,5 – trifosfat	NER = reparare prin excizie de nucleotide (<i>Nucleotid Excision Repair</i>)
ISCN = <i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>	NGS = <i>Next Generation Sequencing</i> (secvențiere de nouă generație)
JAK2 = <i>Janus kinase 2</i>	NH ₃ = amoniac
K = potasiu = kaliu	NH ₄ ⁺ = ion amoniu
LCAT = lecitin colesterol acil transferază	NH ₄ OH = hidroxid de amoniu
LCR = lichid cefalorahidian	NIDDM = diabet zaharat noninsulinodependent
LDH = lactat dehidrogenaza	NIS = <i>sodium-iodide symporter</i> – sistem de sinport Na ⁺ /I ⁻
LDL = <i>low density lipoproteins</i> – LP cu densitate mică	NO = oxidul nitric = EDRF = <i>Endotelium-Derived Re- laxing Factor</i>
LH = hormonul luteinizant	NSE = enolaza neuron specifică
LIA = <i>luminescent immunoassay</i>	OMS = Organizația Mondială a Sănătății
LLA = leucemie limfatică acută	PABA = acid para-aminobenzoic
LLC = leucemie limfatică cronică	PAH = acid p-amino hipuric
LP = lipoproteine	PAI = <i>plasminogen activator inhibitor</i> – inhibitorul activatorului plasminogenului
LPH = lipotropina	PAR-1 = receptor activat de proteaze 1
LPL = lipoprotein lipază	PBG = porfobilinogen
LTP = CETP = proteina de transfer a lipidelor între LP	PCR = <i>polymerase chain reaction</i> (reacție de poli- merizare în lanț)
Lys = lizina	PCSK9 = Proprotein convertase subtilisin/ kexin tip 9
MAO = monoaminoxidaza	
MAPK = <i>mitogen-activated protein kinase</i> - prote- inkinazele activate de mitogeni	
Mb = mioglobină	

PDGF = *platelet derived growth factor* – factorul de creștere endotelial derivat din plachete

PET = tomografie de emisie cu pozitroni

PGI₂ = prostaglandina I₂ = prostaciclina

PIP₂ = fosfatidilinozitol 4,5-difosfat

PKC = proteinkinaza C

PLC = fosfolipaza C

PMN = polimorfonucleare neutrofile

POMC = proopiomelanocortina

PRL = prolactina

PSA = antigen specific prostatic

qPCR = reacție de polimerizare în lanț, în timp real

QF-PCR = *quantitative fluorescence PCR*

RAA = renină – angiotensină – aldosteron

RBF = *renal blood flow* – fluxul sanguin renal

RBP = *retinal, -ol binding protein* – proteina transportatoare de retinal, -ol

RFLP = *restriction fragment length polymorphism* (polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție)

RIA = metode de radioimunochimie

sc-u-PA = prourokinaza

SCC = antigenul celulelor carcinoamatoase scuamoase

SIDA = sindromul de imunodeficiență dobândită

SHBG = Sex hormon binding globulin

SNC = sistem nervos central

SNP = *single nucleotide polymorphism* (polimorfisme mononucleotidice)

SPECT = scintigrafie cu trasori emițători de fotoni unici

SRE = sistemul reticulo-endotelial

SREBPs = Sterol Regulatory Element Binding Proteins

SRMN = spectroscopia în rezonanță magnetică nucleară

STAT = *signal transducers and activators of transcription* - molecule de traducere a semnalului și activare a transcripției

STH = hormonul de creștere (somatotrop)

T3 = triiodtironina; fT3 = triiodtironina liberă; TT3 = triiodtironina totală

T4 = tiroxina; fT4 = tiroxina liberă; TT4 = tiroxina totală

TAFI = *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor* – inhibitorul fibrinolizei activat de trombină

TBG = *thyroxine binding globulin* – globulina care leagă tiroxina

TBPA = *thyroxine binding prealbumin* – prealbumina care leagă tiroxina

TG = trigliceride

TGF α, β = *transforming growth factors α, β* – factorul de creștere transformant α și β

THBR = *thyroid hormones binding ratio* - raportul de legare a hormonilor tiroidieni

TIBC = capacitatea totală de legare a fierului

TIMP = inhibitorul tisular al metaloproteazelor

TK = timidin-kinaza

Tm = *melting temperature* (temperatura de topire)

Tn = troponină

TNFα = factor de necroză tumorală α

TPA = *tissue polypeptide antigen* - antigenul polipeptidic tisular

TRAb = anticorpi anti-receptor de TSH

TRE = *thyroid response elements* – elemente de răspuns la hormonii tiroidieni

TRH = *thyrothropin-releasing hormone* – tireoliberina

TSH = *thyroid-stimulating hormone* – hormonul tireotrop, tireostimulant

TTR = *transthyretin* – transtiretina

TxA₂ = tromboxanul A₂

u-PA = urokinaza

UDP = uridin difosfat

UMP = uridin monofosfat

UTP = uridin trifosfat

VCAM = *vascular cells adhesion molecule*

VGEF = *vascular endothelia growth factor* – factorul de creștere al endoteliilor vasculare

VIP = vasoactive intestinal polypeptide – polipepti-

dul vasoactiv intestinal

VLDL = *very low density lipoproteins* – LP cu densitate foarte mică

VPF = factorul permeabilizator vascular

VSH = viteza de sedimentare a hematiilor

Zn = zinc

Anexa 2

Valorile normale și limitele de decizie clinică ale testelor de laborator

Interpretarea rezultatelor testelor de laborator se bazează pe compararea acestora cu valorile de referință. Valorile de referință (numite adeseori și “valori normale”) sunt valori ale concentrației substanțelor sau activității enzimactice, obținute la populația de referință, care este în mod normal un grup de indivizi sănătoși. Dacă aceste valori prezintă o distribuție normală (gaussiană), scara folosită ca referință este populația de mijloc ± 2 deviații standard (acesta constituie intervalul central de distribuție – 95%). Când este observată o distribuție non – gaussiană într-o populație, valorile transformate matematic (de exemplu transformate logaritmice), sunt folosite pentru a obține o distribuție normală. Dacă valorile se găsesc în afara intervalului de referință se spune că rezultatele variază față de cele observate la populația de referință. De notat este faptul că acestea nu sunt neapărat anormale: prin definiție, 5% dintre indivizii unei populații de referință, vor avea rezultate în afara intervalului de referință. Oricum, cu cât rezultatele sunt mai îndepărtate de intervalul de referință, cu atât este mai probabil ca acestea să se asocieze cu stări patologice.

În unele cazuri (precum în cazul măsurării glucozei, lipidelor, sau troponinei cardiace), în loc de valori de referință, folosim limite de decizie clinică: acestea sunt de obicei derivate din studiile epidemiologice, legând nivelele unui anumit analit de prezența sau riscul apariției anumitor boli.

Mai jos am enumerat intervalele de referință ale mai multor teste de laborator uzuale. De notat că intervalele de referință pot fi dependente de vârstă și sex. De asemenea, ele pot fi diferite în sângele arterial și venos și pot fi influențate de postura, perioadele de post alimentar și anumite diete. Discuțiile detaliate asupra factorilor care influențează rezultatele testelor nu sunt scopul acestei anexe: cititorul poate apela la tratatele biochimice de specialitate. Valorile de referință date în continuare sunt doar orientative: este un semn de bună practică în laboratorul de analize medicale ca totdeauna să se verifice intervalele de referință date. Pe de altă parte, limitele de decizie clinică pentru mulți analiți (inclusiv glucoza și lipidele serice) sunt independente de laborator, deoarece aceste măsurători folosesc metode standardizate și controale de calitate adecvate.

VALORILE DE REFERINȚĂ PENTRU ANUMITE TESTE DE LABORATOR (Intervalele de referință sunt date pentru ser, dacă nu sunt alte categorii citate)

1. Numărătoarea elementelor sanguine

- Hematocritul: 36 – 46 % (femei), 37 – 49 % (bărbați)
- Hemoglobina: bărbați 13 – 18 g/dL, femei: 12 – 16 g/dL; g/L = g/dL x 10
- Numărul de eritrocite: bărbați: $4,4 - 5,9 \times 10^{12}/\mu\text{L}$, femei: $3,8 - 5,2 \times 10^{12}/\mu\text{L}$
- Volumul eritrocitar mediu (VEM): normal 80 – 100 fL
- Numărul de leucocite: $4 - 11 \times 10^3/\mu\text{L}$
- Numărul de trombocite: $150 - 450 \times 10^3/\mu\text{L}$
- Carboxihemoglobina (% din hemoglobina totală): 0,5 – 1,0%

2. Testele de coagulare:

- Timpul parțial de tromboplastină activată (APTT): 30 – 50 secunde
- Timpul de protrombină: 10 – 15 secunde
- Timpul de trombină: 10 – 15 secunde
- D – dimerii de fibrină: < 0,25 g/L

3. Profilul electrolitic (ureea și electroliții)

- Sodiu: 135 – 145 mmol/L
- Potasiu: 3,5 – 5,0 mmol/L
- Bicarbonat: 20 – 25 mmol/L
- Ureea: 2,5 – 6,5 mmol/L (16,2 – 39 mg/dL)
Conversia în unitățile SI: mmol/L x 6,02 = mg/dL
- Azotul ureic (BUN): 2,5 – 6,5 mmol/L (7 – 18,2 mg/dL)
Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 0,357
- Creatinina: 20 – 107 $\mu\text{mol/L}$ (0,23 – 1,20 mg/dL)
Conversia în unitățile SI: $\mu\text{mol/L} \times 0,0113 = \text{mg/dL}$
- Lacuna anionică: 5 – 15 mmol/L
- Osmolaritatea: 285 – 295 mOsmol/L
- Magneziu: 0,7 – 1,1 mmol/L (1,7 – 2,64 mg/dL)
Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 0,411

4. Calciu și fosfor:

- Calciu seric total: 2,2 – 2,6 mmol/L (8,8 – 10,4 mg/dL)
Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 0,25
- Calciu ionic: 1,1 – 1,3 mmol/L (4,4 – 5,2 mg/dL)
- Fosfați (exprimați ca și fosfor): 0,7 – 1,4 mmol/L (2,2 – 5,6 mg/dL)
Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 0,323
- Hormon paratiroidian (PTH): 1,1 – 6,9 pmol/L (11 – 69 pg/mL)

5. Proteinele serice:

- Proteine serice totale: 63 – 86 g/L
Conversia în unitățile SI: $\text{g/L} = \text{g/dl} \times 10$
- Albumina: 35 – 45 g/L
- Proteine urinare excretate: $< 0,15 \text{ g/24h}$
- Excreția de albumine – microalbuminuria $< 30 \text{ mg/24h}$ sau $< 30 \text{ mg/mg creatinina}$
- Proteina C reactivă: $< 10 \text{ mg/L}$
- Proteina C reactivă printr-o metodă cu sensibilitate mare (cantitate sub 10 mg/L), este folosită pentru evaluarea riscului acut cardiovascular
- Transtiretina (prealbumina): 0,2 – 0,5 g/L

6. Metale detectate și proteine care leagă metale:

- Cupru: 12 – 25 $\mu\text{mol/L}$ (80 – 160 $\mu\text{g/dL}$)
Conversia la unitățile SI: $\mu\text{mol/L} = \mu\text{g/dl} \times 0,157$
- Cuprul urinar excretat: 0,2 – 1,6 $\mu\text{mol/24h}$ (6 – 10 mg/24h)
Conversia în unitățile SI: $\text{mmol/24h} = \mu\text{g/24h} \times 0,0157$
- Ceruloplasmina: 200 – 450 mg/L (20 – 45 mg/dl)
- Fier: 10 – 30 $\mu\text{mol/L}$ (56 – 167 mg/dL)
Conversia în unitățile SI: $\text{mmol/L} = \mu\text{g/dL} \times 0,179$
- Feritina: 30 – 280 mg/L . Conversia la SI: $\text{mg/L} = \text{ng/mL}$
- Seleniu: 0,8 – 2,0 $\mu\text{mol/L}$ (6 – 16 mg/dL)
Conversia la unitățile SI: $\text{mmol/L} = \text{mg/dL} \times 7,9$
- Zinc: 9 – 20 $\mu\text{mol/L}$ (60 – 130 $\mu\text{g/dL}$)
Conversia în unitățile SI: $\text{mmol/L} = \text{mg/dL} \times 0,153$
- Transferina: 2,2 – 4,0 g/L

7. Glucoza și hemoglobina glicozilată:

Glucoza plasmatică:

- interval normal: 4,0 – 5,5 mmol/L (72 – 99 mg/dL)
Conversia la unitățile SI: $\text{mmol/L} \times 18 = \text{mg/dL}$
- *à jeun* (fără aport caloric aproximativ 10 h): sub 5,5 mmol/L ($< 100 \text{ mg/dL}$)
- Valori *à jeun* de graniță: peste 5,5 mmol/L , dar sub 7,0 mmol/L (126 mg/dL)
- Diabet: 7,0 mmol/L (126 mg/dL) sau peste

Testul de toleranță la glucoză administrată oral (TTOG): glucoza plasmatică crește la o concentrație de vârf după aproximativ 60 minute și revine la valori apropiate de cele a jeune în 120 minute. Dacă valoarea rămâne peste 11,1 mmol/L (200 mg/dL) la 120 minute, pacientul are diabet, chiar dacă glucoza a jeune este în limite normale. Dacă glucoza serică a jeune este normală, iar cea după încărcarea cu glucoză este între 5,5 și 7,8 mmol/L (100 mg/dL și respectiv 140 mg/dL) pacientul are toleranța scăzută la glucoză.

HbA1c:

- 4 – 6% din HbA totală. Nivele sub 7% indică un control acceptabil al diabetului. Nivele mai mari sugerează un control deficitar.

8. Lipidele:

- Colesterolul total: < 5 mmol/L (190 mg/dL)
- LDL – colesterol: optim < 2,6 mmol/L (<100 mg/dL)
- HDL – colesterol: 1 - 1,6 mmol/L (40 – 60 mg/dL)
Conversia la unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 0,2586
- Trigliceridele: de dorit sub 1,7 mmol/L (150 mg/dL).
Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 0,01129

9. Testele funcției hepatice:

- Bilirubina totală: 8,5-20,5 mmol/L (0,5-1,2 mg/dL) aproximativ 70% bilirubină indirectă (neconjugată).
Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 17,1
- Aspartat transaminaza AST: 5 – 45 U/L
- Alanin transaminaza: ALT: 5 – 40 U/L
- Fosfataza alcalină (ALP): 50 – 260 U/L; (ALP este crescută fiziologic la copii și adolescenți)
- Gamma – glutamil transpeptidaza (GGT): bărbați < 90 U/L, femei < 50 U/L

10. Metaboliții cheie:

- Amoniemia: 15 – 88 μmol/L (25 – 150 μg/dL)
Conversia în unitățile SI: μmol/L x 1,7 = μg/dl
- Lactat: 0,7 – 1,8 mmol/L (6 – 16 mg/dl)
Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 0,111
- Porfobilinogen urinar: < 9 μmol/24h (<2 mg/24h)
Conversia în unitățile SI: μmol/24h = mg/24h x 4,42
- Piruvat arterial: 0,2 – 0,8 mmol/L (0,2 – 0,7 mg/dL)
Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 0,114
- Urat: 0,20 – 0,5 mmol/L (3,5 – 8,0 mg/dL) la bărbați; 0,1 – 0,4 mmol/L (2,5 – 6,2 mg/dL) la femei
Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 0,0595

11. Gazometria sanguină:

- Concentrația arterială de ioni de hidrogen: 36 – 43 nmol/L (pH: 7,37 – 7,44)
- pCO₂: 4,6 – 6,0 kPa (34 – 45 mmHg)
- pO₂: 10,5 – 13,5 kPa (79 – 101 mmHg)
Conversia în unitățile SI: kPa x 7,5 = mmHg

12. LCR

- Raportul concentrațiilor glucozei din LCR și plasmatică: 0,65
- Lactatul din LCR: $< 2,2 \text{ mmol/L}$ ($< 20 \text{ mg/dL}$)
Conversia la unitățile SI: $\text{mmol/L} = \text{mg/dL} \times 0,111$

13. Teste endocrine

Determinări ale funcției tiroidei

- TSH: $0,4 - 4 \text{ mU/L}$
Conversia la unitățile SI: $\text{mU/L} = \mu\text{U/dL}$
- Tiroxina (T4): $55 - 144 \text{ nmol}$ ($4,2 - 11 \mu\text{g/dL}$)
Conversia la unitățile SI: $\text{nmol/L} = \mu\text{g/dL} \times 12,87$
- Triiodotironina (T3): $0,9 - 2,8 \text{ nmol/L}$ ($0,6 - 1,8 \text{ ng/mL}$)
Conversia la unitățile SI: $\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times 1,54$

Determinări ale funcției suprarenalei

- Cortizolul la ora 08.00: $190 - 690 \text{ nmol/L}$ ($7 - 25 \mu\text{g/dL}$)
- Cortizolul la ora 24.00: $< 50 \text{ nmol/L}$ ($< 2 \mu\text{g/dL}$)
- Cortizolul liber urinar: $< 250 \text{ nmol/24h}$
- Conversia la unitățile SI: $\text{nmol/L} = \mu\text{g/dL} \times 27,59$
- ACTH: $< 80 \text{ ng/L}$
Conversia la unitățile SI: $\text{ng/L} = \text{pg/ml}$
- 17 – hidroxiprogesteron: $< 50 \text{ nmol/L}$ ($< 16 \text{ pg/L}$)
Conversia la unitățile SI: $\text{nmol/L} = 3,026 \times \text{pg/L}$
- Aldosteron bazal $83 - 277 \text{ pmol/L}$ ($3 - 10 \text{ ng/dL}$), de virf: $139 - 832 \text{ pmol/L}$ ($5 - 30 \text{ ng/dL}$)
Conversia la unitățile SI: $\text{pmol/L} = 27,74 \times \text{ng/dL}$
Dietele sărate influențează rezultatele.

14. Diagnosticul infarctului miocardic:

Troponinele cardiace (de notat ca limitele de decizie clinică pentru troponinele cardiace pot varia în diferite laboratoare)

- Troponina T: $> 0,1 \text{ ng/mL}$
- Troponina I: $> 2,5 \text{ ng/mL}$
- Creatin kinaza CK: $< 210 \text{ U/L}$
- Raportul fracțiunii creatin kinază CK – MB și CK totală: $\text{CK-MB/CK} < 6\%$

15. Markerii ai pancreatitei:

- Amilaza: $0 - 100 \text{ U/L}$
- Lipaza: $20 - 140 \text{ U/L}$

16. Neurotransmițători și metaboliții lor:

- Norepinefrina: $1094 - 1625 \text{ pmol/L}$ ($185 - 275 \text{ ng/L}$)

- Norepinefrina urinară: <900 nmol/24h (<152 mg/24h)
Conversia la unitățile SI: pmol/L = ng/L x 5,9
- Epinefrina: 164 – 464 pmol/L (30 – 85 ng/L)
Conversia la unitățile SI: pmol/L = ng/L x 5,5
- Epinefrina urinară: < 230 nmol/24h (<42 mg/24h)
- Acidul vanil mandelic urinar (VMA): < 35,5 mmol/24h (< 7,0 mg/24h)
Conversia la unitățile SI: μmol/24h = mg/24h x 5,05
- Acidul 5 – hidroxil indolacetic urinar (5 – HIAA): metabolitul major al 5- HT;
interval de referință: 10 – 52 mmol/ 24h (3 – 14 mg/ 24 h)
Conversia la unitățile SI: mmol/24 h = mg/24 h x 5,24

17. Vitaminele:

- Vitamina A: 1,05 – 2,8 μmol/L (300 – 800 μg/dL)
Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 0,0349
- Vitamina B 6 (piridoxal fosfat): 5 – 50 μg/L , deficiența < 3 μg/L
- Vitamina B 12: 148 – 590 pmol/L (200 – 800 pg/mL)
Conversia în unitățile SI: pmol/L = pg/ml x 0,7378
- Vitamina C plasmatică: 0,6 – 2,0 mg/dL, nivele plasmatic acceptabile 0,30 mg/dl,
în leucocite >15 mg/dL.
Conversia în unitățile SI: mmol/L = mg/dL x 56,8
- Vitamina D (25-OH D3): iarna 35 – 104 pmol/L (14 – 42 ng/mL);
vara: 37 – 197 pmol/L (15 – 80 ng/mL)
Conversia în unitățile SI: pmol/L = ng/ml x 2,469
- Vitamina E: 11,6 – 37,1 μmol/L (0,5 – 1,6 mg/dL)
Conversia în unitățile SI: μmol/L = μg/dl x 23,22
- Folați: > 7 nmol/L (3 ng/mL)
Conversia în unitățile SI: nmol/L = ng/mL x 2,27
- Folații din hematii: 362 – 1586 nmol/L (160 – 700 ng/mL)
Conversia în unitățile SI: nmol/L = ng/mL x 2,266

Anexa 3

O cronologie a biochimiei

- 1770-1774 **Priestley** a descoperit O_2 și a arătat că este produs de plante și consumat de animale
- 1773 **Rouelle** a izolat ureea din urină (primul compus organic izolat)
- 1804 **Dalton** a enunțat teoria atomică
- 1806 **Vauquelin și Robiquet** au izolat primul aminoacid (Asparagina)
- 1810 **Gay - Lussac** a dedus ecuația fermentației alcoolice
- 1837 **Berzelius** a postulat natura catalitică a fermentației și apoi a identificat acidul lactic ca un produs al activității musculare
- 1838 **Schleiden și Schwann** au enunțat teoria celulară
- 1838 **Mulder** a realizat primele studii sistematice asupra proteinelor
- 1842 **Mayer** a enunțat prima lege a termodinamicii și a arătat aplicabilitatea ei la organismele vii
- 1850 - 1855 **Bernard** a izolat glicogenul din ficat, demonstrând că acesta este transformat în glucoza din sânge; a descoperit gluconeogeneza
- 1857 **Kölliker** a descoperit mitocondriile în mușchi
- 1859 **Darwin** a publicat "Originea speciilor"
- 1864 **Hoppe - Seyler** a fost primul care a obținut o proteină (Hemoglobina) în stare cristalină
- 1866 **Mendel** și-a publicat experiențele care l-au condus la enunțarea principiilor segregării genelor
- 1869 **Miescher** a descoperit ADN-ul
- 1893 **Ostwald** a dovedit că enzimele sunt catalizatori
- 1897 -1906 **Eijkman** a arătat că beri - beri este o maladie produsă de lipsa unui component în dietă, care se găsește în cortexul boabelor de cereale
- 1902 **Fischer și Hofmeister** au demonstrat că proteinele sunt polipeptide
- 1905 **Knoop** a descoperit b oxidarea acizilor grași
- 1907 **Fletcher și Hopkins** au arătat că acidul lactic este produs în mușchi din glucoză, în timpul contracției anaerobe
- 1909 **Sørensen** a arătat efectul pH-ului asupra activității enzimaticice
- 1912 **Warburg** a arătat necesitatea fierului pentru respirație, a postulat existența unei enzime respiratorii necesară activării oxigenului, inhibată de cianură
- 1913 **Michaelis și Menten** au dezvoltat o teorie cinetică a acțiunii enzimelor
- 1925 - 1930 **Levene** a elucidat structura mononucleotidelor și a arăta că sunt unități constitutive ale acizilor nucleici
- 1925 - 1930 **Svedberg** a inventat ultracentrifuga

- 1928 **Euler** a izolat carotenul
- 1928 - 1932 **Szent - Györgyi** a izolat acidul ascorbic
- 1929 **Fiske și Subbarow** au izolat ATP și fosfocreatina din extracte de mușchi
- 1930 **Karl Landsteiner** premiul Nobel pentru descoperirea grupelor sanguine
- 1933 **Krebs și Henseleit** au descoperit ciclul ureei
- 1933 **Embden și Meyerhof** au demonstrat intermediarii cruciali în calea glicolică
- 1935 **Schoenheimer și Rittenberg** au folosit pentru prima dată izotopii radioactivi ca trăsori în studiul metabolismului intermediar al hidraților de carbon și lipidelor
- 1935 **Davson și Danielli** au postulat un model pentru structura membranelor celulare
- 1937 **Krebs** a postulat ciclul acidului citric
- 1939 - 1941 **Lipmann** a postulat rolul central al ATP în transferul de energie
- 1939 - 1946 **Szent - Györgyi** a descoperit actina și actomiozina
- 1943 **Ochoa** a demonstrat că raportul P : O al fosforilării oxidative pentru ciclul acizilor tricarboxilici, este 3
- 1943 **Henrik Dam și Edward Adelbert Doisy** - premiul Nobel pentru decoperirea vitaminei K
- 1948 **Hogeboom, Schneider și Palade** au utilizat metoda centrifugării diferențiale pentru fracționarea celulară
- 1950 **Pauling și Corey** au propus structura în a - helix a a - keratinelor
- 1950 - 1953 **Chargaff** a descoperit echivalențele de baze în ADN
- 1951 **Lynen** a postulat rolul CoA în oxidarea acizilor grași
- 1952 - 1954 **Zamecnik** a descoperit sediul sintezei proteice
- 1953 **Sanger și Thompson** au determinat secvența de aminoacizi a lanțurilor A și B ale Insulinei; doi ani mai târziu, Sanger a stabilit poziția legăturilor disulfurice
- 1953 **Watson și Crick** au postulat modelul în dublu a-helix al structurii ADN
- 1957 **Sutherland** a descoperit AMPc
- 1958 **Crick** a enunțat dogma centrală a geneticii moleculare
- 1960 **Kendrew** a utilizat analiza cu raze X de înaltă rezoluție pentru determinarea structurii mioglobinei de cașalot
- 1961 **Jacob, Monod și Changeux** au propus o teorie a funcției și acțiunii enzimelor alosterice
- 1961 **Jacob și Monod** au postulat funcția ARN-ului mesager
- 1961 - 1965 laboratoarele lui **Nirenberg, Khorana și Ochoa** au identificat codul genetic
- 1973 **Cohen, Chang, Boyer și Helling** au raportat primele experimente de clonare a ADN-ului
- 1978 **Tonegawa** a demonstrat secvența ADN a genei unei imunoglobuline
- 1981 - 1982 **Palmiter și Brinster** au obținut șoarecele transgenic
- 1983 **Barbara Mc Clintock** descoperă structurile genetice mobile
- 1983 **Mullis** a amplificat ADN-ul prin reacția polimerazică în lanț (PCR)
- 1984 **Niels, Kohler, Milstein** - descoperirea principiului de sinteză a anticorpilor monoclonali
- 1985 **Brown și Goldstein** - premiul Nobel pentru descoperirea receptorilor LDL și rolului acestora în controlul metabolismului colesterolului și ateroscleroză
- 1986 **Cohen și Levi-Montalcini** - premiul Nobel pentru descoperirea factorilor de creștere

- 1987 **Tonegawa** - premiul Nobel pentru descoperirea principiului genetic al generării diversității anticorpilor
- 1989 **Bishop și Varmus** - premiul Nobel pentru descoperirea originii celulare a oncogenelor retrovirale
- 1992 **Fischer și Krebs** – mecanismul reglator biologic al fosforilării reversibile a proteinelor
- 1994 **Gilman și Rodbell** - premiul Nobel pentru descoperirea proteinelor G și rolului lor în transmiterea semnalelor intracelular
- 1997 **Prusiner** - premiul Nobel pentru descoperirea Prionilor și a rolului acestora în infecții
- 1998 **Furchott, Ignarro și Murad** - rolul NO în activitatea sistemului cardiovascular
- 1999 **Gunter Blobel** - premiul Nobel pentru fiziologie și medicină pentru descoperirea faptului că proteinele au semnale intrinseci care guvernează transportul acestora și localizarea în celulă
- 2000 **Arvid Carlsson, Paul Greengard, Eric R Kandel** - premiul Nobel pentru fiziologie și medicină pentru descoperirile lor în ceea ce privește transducția semnalelor în sistemul nervos
- 2001 **Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt, Paul M. Nurse** - premiul Nobel pentru fiziologie și medicină pentru descoperirile lor legate de aspecte cheie ale ciclului celular
- 2002 **Sydney Brenner, H. Robert Horvitz, John E. Sulston** - premiul Nobel pentru fiziologie și medicină pentru descoperirile lor privind reglarea genetică a dezvoltării organelor și moartea celulară programată
- 2003 **Lauterbur și Mansfield** - premiul Nobel pentru descoperirea rolului rezonanței magnetice în imagistica medicală
- 2004 **Axel și Buck** - premiul Nobel pentru fiziologie și medicină pentru descoperirea receptorilor olfactivi; **Ciechanover, Hershko și Rose** au primit premiul Nobel pentru chimie pentru descoperirea ubiquitinelor
- 2005 **Marshall și Warren** - premiul Nobel pentru descoperirea rolului în gastrite și ulcerul peptic al *Helicobacter Pylori*
- 2006 **Andrew Z. Fire, Craig C. Mello** au primit premiul Nobel pentru fiziologie și medicină pentru că au elucidat un mecanism natural de control al fluxului informațional genetic (inhibarea prin interferență a ARN de către ARN dublu catenar)
- 2007 **Sir Martin Evans, Mario Capecchi și Oliver Smithies** au primit premiul Nobel pentru fiziologie și medicină pentru cercetările în domeniul modificărilor genetice realizate prin intermediul celulelor stem
- 2008 **Luc Montagnier și Francoise Barre-Sinoussi** au primit premiul Nobel pentru fiziologie și medicină, pentru descoperirea HIV și respectiv, **Harald zur Hausen** pentru descoperirea faptului că HPV cauzează cancer de col uterin
- 2009 **Jack W. Szostak, Carol W. Greider și Elizabeth Blackburn** au primit premiul Nobel pentru fiziologie și medicină pentru descoperirea telomerazelor
- 2010 - cercetătorul britanic **Robert Edwards**, considerat “părintele fertilizării in vitro”, a fost recompensat cu Premiul Nobel pentru Medicină pentru punerea la punct a acestei tehnici de inseminare artificială creată pentru a combate infertilitatea
- 2011 **Bruce Beutler, Jules Hoffmann și Ralph Steinmann**, au primit premiul

Nobel pentru fiziologie și medicină pentru cercetările asupra sistemului imun înăscut

- 2012 **John Gurdon, din Marea Britanie, și Shinya Yamanaka, din Japonia** au primit premiul Nobel pentru fiziologie și medicină pentru cercetările de avangardă legate de modul în care celule specializate pot fi reprogramate pentru a deveni celule stem, pluripotente
- 2012 **Robert Lefkowitz și Brian Kobilka din SUA** au obținut Premiul Nobel pentru Chimie, pentru studiile lor asupra receptorilor cuplați cu proteine G.
- 2013 **James Rothman, Randy**

Schekman și Thomas Sudhof au primit premiul Nobel pentru fiziologie și medicină **pentru descoperirile lor asupra mecanismului care reglează circulația veziculară (un sistem major de transport în celulele noastre)**

- 2014 Premiul Nobel pentru chimie a fost atribuit cercetătorilor **Eric Betzig, Stefan W. Hell și William E. Moerner, pentru dezvoltarea microscopiei cu fluorescență de super-rezoluție**
- 2014 **John O'Keefe (SUA), May-Britt Moser și Edvard Moser (Norvegia)** au fost recompensați cu premiul Nobel pentru medicină pentru descoperirea celulelor care constituie un sistem de poziționare în creier

Anexa 4

Index de subiecte

5

5'-deiodinare 192

A

- ABC A1 59, 63-64, 72
Acetil CoA 13-14, 16, 18-20, 22, 27, 31, 38, 66, 109, 110-111, 194, 215, 247
Acetilcolină 13, 136-137, 146, 153, 156, 181
Acetonă 27, 38, 66
Acid acetic 328
Acid arahidonic 46-48, 158-161
Acid aspartic 3
Acid docosahexanoic 46, 92
Acid eicosapentanoic 46-47, 92
Acid glutamic 3, 33
Acid homovanilic 252
Acid lactic 13-14, 28, 108, 234
Acidoză 37-38
Acid uric 229-230, 232-239
Acizi biliari 15, 20, 45, 60-61, 64, 88, 194
Acizi grași 46, 56-59, 124, 136, 170, 172, 194, 207, 232
Actină 100, 102-107, 113, 245, 263
ADH (hormon antidiuretic) 126, 148-149, 156, 171, 180-181, 200, 272-273
ADN polimerază 313, 315, 338-339, 341-342, 346, 348, 351
Adrenalină 11-13, 24, 26-28, 46, 181, 194, 267, 271
Alanină 4, 14-15, 21
Alanin transferază (ALT) 15
Albumină 4, 27, 36, 47, 50, 55, 56, 61, 65, 73, 89, 124, 192, 218, 255, 339
Albumină plasmatică 61
Alcaloză 273
Alcool 45, 71, 78, 87, 93, 234-235, 347
Aldolază 17
Aldosteron 124, 126, 179, 181, 216, 222, 271
Alfa-fetoproteină 249, 251, 255, 272, 290
Amenoree 172, 176, 226
AMP (adenozin monofosfat) 11, 13, 16, 23, 229, 230, 232
AMPc 7, 11-13, 23, 24, 57, 129, 133, 137, 139, 140, 147-153, 155, 162-163, 169, 174-176, 178, 181, 214
Anemie 114, 306, 316
Anemie hemolitică 306
Angiotensină (AT) 95, 126, 156, 168, 233, 237
ANP (peptidul natriuretic atrial) 125
Anticorp 3, 33-36, 65, 77, 81, 123, 145, 199, 200-203, 206-209, 248, 250, 253-254, 257-260, 273, 282-283, 287
Anticorp anti-receptor pentru TSH 209
Antigen 3-4, 33, 81, 125, 206, 248-250, 253, 265, 279, 283, 315
Antigen carcino-embrionar 248-249, 251, 253-254, 294
Antigene de diferențiere celulară 250
Antigene onco-fetale 248-250
Antigen gastro-intestinal CA19-9 251-252, 256, 257-258, 265, 291
Antigen gastro-intestinal CA 72-4 251, 257, 290-291
Antigen ovarian - CA 125 (carbohydrate antigen 125) 252, 260, 287-289, 291, 292-294

Antigen polipeptidic tisular (TPA) 251, 264, 265-277, 287, 293
 Antigen specific prostatic (PSA) 248-249, 261-263, 274, 287-288, 292-293
 Antigen tumoral al vezicii urinare (Bladder Tumor Antigen - BTA) 251, 266, 293
 Antigenul celulelor carcinomatoase scuamoase (SCC) 252, 264, 294
 Antigenul tumorilor mamare - CA 15-3 252, 258-259, 264, 287, 291
 Antitrombină 352
 Apo AI Milano 64
 Apoproteine 36, 50-52, 59-60, 64, 70
 Apoptoză 125, 153, 155, 234, 243-246, 266, 295-296, 359
 APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxilation) 266, 271-272
 APUD-oame 268, 271, 276
 Aquaporine (AQP) 181-182, 184
 Arginină 26, 171, 331
 ARN mesager (ARNm) 59, 84, 131, 220, 253, 279, 295-297, 306-309, 323, 346, 353, 360
 Ateroscleroză 74

B

Barieră hemato-encefalică 5
 Baze azotate 338, 342
 Bcl-2 245
 Bence-Jones (proteinurie) 248, 294
 BER 312, 314, 315, 316
 Beta-LPH 168, 177
 Bicarbonat 39, 40
 Bilirubină 21, 35
 Bilirubină totală 257
 BMR (boală minimă reziduală) 329, 330
 Boală trofoblastică gestațională 292

C

Calcitonină 139, 156, 187, 252, 270-272, 287-289
 Calcitriol 196
 Calciu ionic (Ca^{2+}) 7, 60, 133, 135, 140, 147-148, 150-151, 154-155, 157, 162, 195, 281
 Calmodulină 7, 10, 12, 102, 104, 155

Cancer colorectal 248, 252, 291, 313, 322-323
 Cancer de vezică urinară 266, 293
 Cancer gastric 257, 290, 322, 326
 Cancer hepatic 290, 322
 Cancer mamar 254, 260, 264, 272, 278, 291, 322, 359
 Cancer ovarian 261, 291, 322
 Cancer pancreatic 255, 257, 290, 323
 Cancer prostatic 248, 252, 262-263, 275, 292-293
 Cancer pulmonar 252, 271-272, 276, 293, 322, 359
 Cancer testicular 252, 292
 Carcinom de prostată 262, 279, 326
 Catalizatori 21, 46
 Catecolamine 13, 57, 111, 119, 148, 156, 162, 193, 195, 267, 268, 270, 287
 Centru activ 192
 CERP (Cholesterol Efflux Regulatory Protein) 63-64
 Cetoacidoză 33, 39
 Cetoacidoză diabetică 37
 CGH 318, 325, 336, 360-362
 Chilomicroni 46, 50, 53-56, 59-61, 67, 69, 71-72, 92
 Ciclooxygenază 47-48, 159-161, 236
 Ciclu Cori 15
 Ciclu Krebs 13, 20, 27, 66, 110-111
 Ciclul alaninei 15
 Circuit enterohepatic 88-90
 Ciroză 14, 73, 204, 250, 253, 255-257, 259, 261, 264-265, 290, 325
 Cisteină 14, 57, 58, 64, 83, 138, 142, 147, 196, 245
 Cistină 87
 Citocromi 18, 89, 117, 215, 218-219
 Citokine proinflamatorii 125, 234
 CK-MB 121-122
 CK-MM 107, 121-122
 CLIP (corticotropin-like intermediary peptide) 177
 Clorură (Cl^-) 56, 87, 135, 150
 Codon 306-309, 331
 Coenzimă Q 117
 Coenzime 3, 16-18, 21, 27, 64, 109, 150, 247

Colagen 58, 80-81, 126, 180, 195
Colestază 55, 235
Colesterol 15, 20-21, 36, 45-50, 53, 55-66,
69-77, 81-83, 86-94, 178, 194, 200,
214-216
Colinesterază 229
Comă hiperosmolară 37, 39, 40
Complement (sistem) 4, 52
Contracție miocardică 104, 106, 111, 150,
195
Corpi cetonici 16, 23, 38, 40, 66, 108, 110
Corticoliberină 168
Corticotropină 148, 177
Cortizol 24, 26-28, 131, 169, 172, 178-180,
207, 216, 252, 271
Creatină 112
Creatinină 35, 90
Creatinkinază 116, 121-122
Cromatină 144, 220, 245, 311, 326, 359
Cromozomi 53, 64, 70, 83, 150, 232, 253,
255, 259-260, 264, 271, 296, 303-305,
321, 323-325, 327, 335, 348-349, 352
CTP (citrate transporter protein) 247
Cushing (sindrom) 180, 204, 270-271
CYFRA 21-1 263-264

D

Datorie de O_2 108
Deleție 133, 296, 306, 308-309, 313, 316,
344, 355
Derepresie 269
Deshidratare 37-39, 203
Diabet Autoimun Latent al Adultului (LADA)
34
Diabet insipid 182-184
Diacilglicerol (DAG) 12, 49, 140, 155-156,
169, 181, 191, 212
Diiodtirozină (DIT) 189-190, 208
Dislipidemii 66-72, 85, 93
Dislipidemii primare 68-69
Dislipidemii secundare 68, 72
Disproteinemii 69
Distrofie musculară 309-310, 351
Down (sindrom) 255

E

Edem 37, 200, 261, 273

EGF (epidermal growth factor) 213
Enolază 252
Enolază neuron specifică (NSE) 275-276
Enzima de conversie a angiotensinei (ACE)
95
Eritropoietină 223, 252
Eroare de replicare 304, 312, 318, 342
Estrogeni 131, 163, 171-177, 185, 211,
216-227, 233, 251-252, 259, 291
Etanol 181, 337, 354
Etilen diamino tetra acetat (EDTA) 335, 346,
354
Exoni 303, 305-306, 309, 331, 352-355

F

Factor de creștere derivat din plachete
(PDGF) 81, 245
Fanconi (sindrom) 316
Fenilalanină 308
Feocromocitom 252, 270-271
Feritină 252, 278-279
Fibrați 88-90, 111
Fibrină 53
Fibrinogen 89
Fibronectină 142
Fibroză chistică 308, 345, 359
Fier 147, 278
FISH (Fluorescent in situ hybridization) 260,
327-329, 341, 361
Fosfatază acidă 274
Fosfatază acidă prostatică (PAP) 251-252,
274
Fosfatază alcalină 90, 172, 195
Fosfați 45
Fosfatidilinozitol 4,5-difosfat 46, 155-156,
253
Fosfoinozitol bifosfat (PIP2) 140
Fosfolipază C 12, 139, 158, 181
Fosfolipide 45-46, 48, 50, 54-56, 60, 62-63,
148, 156, 159, 161
Fosforilare 7, 10, 12, 14, 18-19, 24, 50, 103-
104, 107, 112, 141, 142, 144, 147,
150, 153, 155, 158, 159, 161-162,
246, 294, 297
Fosforilază 6, 9, 10-13, 24, 124, 238
Fosforilazokinază 10, 11

Free PSA 262

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 348

G

Galactoză 1, 3, 5-6

Gastrină 169, 252, 270-272

Gene supresoare 248, 321, 322-326, 327

Genom 137, 142, 295-296, 303-306, 309-312, 316-318, 323, 327, 331, 335, 338, 349, 358, 361

GGT 93, 196

Ginecomastie 177, 221, 225-226, 274

Glicogen sintază 7, 12

Glicoliză aerobă 108, 110-111

Glicoliză anaerobă 16-17, 20-21, 110-111, 115-116

Globuline 54, 131, 195, 198-199, 201, 206

Glucagon 11-12, 23-24, 26-29, 31, 33, 41, 46, 111, 148-149, 167, 169, 171, 252, 270

Glucokinază 7, 16, 21-23, 28

Glutamină 230, 232

GLUT (transportori de glucoză) 5, 7, 8-9, 20-21

GMP (guanozin monofosfat) 139, 147, 151-153, 162, 229, 230, 232

GnRH (hormon eliberator de gonadotropină) 168-169, 172-173, 176, 211-214, 224-226

Gonadotropină corionică umană (hCG) 173-174, 176, 190, 202, 222-226, 271-274, 292

Graves (boală) 146, 201-203, 206, 209

H

HDL2 50-51, 56, 60, 63, 194

HDL3 51, 56, 62-63, 194

HDL-C 64, 73-75, 87, 89-95

Hemoglobină 35-36, 108

Hemoglobină glicozilată 35-36

Hemoliză 282

Hepatită acută 204, 259

Hepatită cronică 259

HER-2/neu 259-260

Hexokinază 7, 16, 21-23, 27, 110

Hidrogen gazos (H_2) 48, 148, 159-160

High molecular weight kininogen (HMWK) 279

Hipercalcemie 203, 273

Hipercolesterolemie familială 90, 92-93

Hiperglicemie 24, 27, 31, 33, 35, 40, 95, 171, 267

Hiperlipoproteinemie 36, 80, 229

Hiperparatiroidism 273

Hiperpotasemie 38, 40

Hipertiroidism 146, 173, 175, 191-192, 197-198, 200, 209, 226, 274

Hipertrigliceridemie 67-69, 71-78, 89, 229

Hipoalbuminemie 73

Hipofiză 26, 167, 169-181, 184, 190-191, 197, 202, 204, 211-212, 225-226, 269

Hipokaliemie 203, 273

Hiponatremie 40, 184, 200, 273

Hipopituitarism 199

Hipotalamus 83, 167-170, 175-177, 181-182, 184, 191, 198, 211-214, 225

Hipotiroidism 70-72, 86, 171-175, 191-192, 194-201, 204-205, 207-209, 224

Hipovolemie 39, 123

Hirsutism 180, 226-227

Histidină 324

Histone 220, 311, 326

HLA 4, 31, 279-280

HMG-CoA reductază 45, 93, 194

Homocisteină 80

Hormon de creștere (GH) 24, 26, 28, 170

Hormon foliculostimulator 148, 168, 173, 272

Hormon luteinizant 148, 162, 173

Hormon melanocitostimulator 168, 177

Hormon tireotrop 146, 272

I

Icter obstructiv 257

IGF 169-170, 172, 195, 213-214, 274

Imunoglobuline G 201

Infarct miocardic acut (IMA) 73, 117, 120-124, 173

Inozitol 1,4,5 - trifosfat 45, 155-156, 181, 191, 212

Insulină 5-10, 20-21, 23-24, 26-29, 31, 33,

34, 36-42, 46, 57, 59, 82-84, 95, 110-111, 116, 142, 145-146, 155, 169-172, 179, 194, 226-227, 233, 252, 270-272, 274

Introni 303, 306, 309, 317

Ischemie miocardică 120-121, 124, 126

Izoenzime 22-23, 102, 121, 157, 274-275, 277

K

Kinază Janus (JAK) 246, 324

L

Lactat dehidrogenază (LDH) 14, 110, 252, 292

Laser Capture Microdissection - LCM 298

LCAT 50, 52, 56, 61-63

LDL-Colesterol 45-46, 50, 53-60, 62, 64-67, 69-77, 80-81, 83, 86, 88-95, 194, 200, 203, 215, 222-223

Legătură de hidrogen 355

Leucemie 230, 234, 250, 252, 277-279, 281, 305, 323-324, 328-329, 347, 358

Ligază 297, 314-315

Limfom 230, 234, 250, 277, 279-281, 322-324, 328

Lipază 27, 36, 46, 50, 52, 56-57, 60, 72, 159, 194

Lipidogramă 54, 74

Lipoproteina (a), Lp(a) 53, 77-78, 91, 92

Lipoproteină X 53, 55

Lipoproteine oxidate 76, 80-81, 126

Lipoproteinlipază 60, 108, 111

Lipotropină 168

Litiază 232, 266

Lizină 53

LPL 36, 50, 52, 55-56, 58, 60-62, 69, 72-73, 89

LRP 52-53, 56-57, 59-62

M

Macrofage 57-59, 62, 76, 80-81, 84, 124, 173, 234

Magneziu (Mg^{2+}) 92, 135, 170, 339

MAPK (mitogen-activated protein kinase)

246

Melanom malign 281, 293

Meromiozină grea 100, 102, 105

Meromiozină ușoară 100, 102

Meta-dinitro-benzen (mDNB) 19

MicroARN (miARN) 323

Mielom multiplu 281, 294

Miocard hibernant 117-118

Mioglobină 108, 121

Monoiodotirozină 189

N

NAD⁺ 14, 16, 18, 65, 109

NADP⁺ 20

Natrium-iodide symporter (NIS) 187-188

Natriu, sodiu (Na^{+}) 5, 37, 39, 113, 135, 137, 153-154, 170, 187, 222, 237

Nefrotic (sindrom) 70, 72-73, 204, 278

Neoplazie endocrină multiplă (MEN) 269, 270

Neuroblastom 252, 271, 276

NSE vezi Enolază neuron specifică

Nucleotide 59, 148, 151-152, 196, 230-232, 238-239, 276, 303, 305-306, 308, 313-314, 315, 317, 329-330, 339, 342, 344, 351-353, 355-357

Nucleozide 230-231, 238-239

O

Obezitate 33, 70, 74, 76, 78, 83-86, 93-94, 171, 180, 219, 221, 224, 227, 229, 318

Oncogenă BCL 324

Oncogene 244, 246, 248, 321-323, 326, 355

Osmolaritate 37, 39, 181-184, 273

Osteoporoză 180, 203

Oxitocină 180-181, 185

P

P53 245, 246, 316

Pancreatită acută 69, 92, 253, 265

Pancreatită cronică 34, 257

Paradoxul oxigenului 119

Parathormon (PTH) 146, 148, 252, 270-272

PCR 80, 90, 95, 249, 263, 295, 298, 327-331, 335-336, 338-344, 346-357, 359, 361

PDGF *vezi* Factor de creștere derivat din plachete

Peptid C 26

Peptid inhibitor gastric (GIP) 26

Peptid natriuretic de tip B (BNP) 84, 124-125, 261

Perete vascular 56, 77-81, 84

Peroxidază 159, 237

PIVKA 256

Plachete sangvine 236

Plasminogen 53, 76, 78, 82

PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) 58-59, 111, 112

Primer 7, 329-330, 339-340, 342-348, 350-352, 356-357

Prolactină 145-146, 168-170, 172-173, 224, 252, 271

Prolină 58, 331

Proopiomelanocortina (POMC) 168, 170, 177

Prostaciclina 49, 91, 148, 160, 236

Prostaciclin sintetază 236

Proteina 22 a matrixului nuclear 266

Proteină C reactivă 4, 82-83, 124

Proteină S-100 252, 281

Proteine de fază acută 261

Proteine G 135, 137, 140, 162, 190

Proteinkinaza A 104, 181

Proteinkinaza C 7

Proteinkinaze 7, 24, 57, 103, 181

Proteinurie Bence-Jones *vezi* Bence-Jones (proteinurie)

Proteom 295-296

Proteomică 249, 295-297

Protoni 18, 23, 38, 40, 114, 142

Protrombina 256

PSA *vezi* Antigen specific prostatei

Q

QF-PCR 342, 348-349

qPCR 328-329, 331, 336, 342, 347

R

RAA (sistemul renină-angiotensina-aldosteron) 89

Radicali liberi 81, 87, 119, 189, 311

RAS (gene) 263, 322-323, 326, 355

Receptori scavenger 58-59, 63, 76

Receptor LDL 52, 58

Receptor pentru GH 171

Receptorul 2 al factorului de creștere epidermic (Human Epidermal growth-factor Receptor 2) 259

Receptorul activării proliferatorului peroxizomilor *vezi* PPAR

Renină 126, 252

Represie 246, 326

RFLP 317, 329, 336, 342-343

ROC (curbe) 286-287

RXR (Retinoid X Receptor) 58, 64, 89, 112, 196, 197

S

Săruri biliare 64

SCC *vezi* Antigenul celulelor carcinoatoase scuamoase

Secretină 60, 167, 169

Serină 3, 8, 10, 14, 57, 104, 141, 150, 155, 158-159, 162, 260, 297

Serotonină (5 hidroxi triptamină) 81, 148, 156, 252, 268-269

Sindroame carcinoide 249, 268-269

Sindrom mielodisplazic 278

Sindrom X fragil 310

Sistem HDL 62-63

Somatoliberină 167

Somatostatină 156, 168-171, 175, 191

Specificitate 3, 49, 121, 123, 139, 150, 155, 162, 238, 253, 256-265, 274, 279, 282, 284, 286, 294, 341, 350, 352

Statine 65, 88-91, 93-95

STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) 246, 331

T

Talasemie 278

Taq polimerază 339

TBG (thyroxine binding globulin) 192

TBPA (thyroxine-binding prealbumin) 192

Tehnica microdisecției tisulare 297, 298

Test de toleranță la glucoză orală (TTGO) 32, 34-35

TGF (transforming growth factor) 212-213

Timidin-kinază (TK) 252, 276-278
Tireoglobulină 251-252, 279, 289
Tireoliberină (TRH) 168-169, 173-175, 190-191, 199, 205-206
Tiroglobulină 188-190, 199, 203, 206
Tiroidă 187-188, 191-193, 198, 200, 209, 254, 265, 279, 288
Tiroxină 28, 133, 146, 201, 222, 279
Tiroxină liberă (fT4) 175, 199, 200, 203-205, 207-209
Tirozină 7-8, 142, 187, 189-190, 203, 267, 297
Tomografie prin emisie de pozitroni (PET) 113, 118
TPA *vezi* Antigen polipeptidic tisular
Transaminază 14, 90
Transtiretină 192
Treonină 8, 14, 26, 57, 141, 150, 155, 158, 162, 297
Trigliceride 21, 27-28, 36, 45-46, 48-50, 55-57, 60, 65-66, 69, 73, 75, 83, 108, 111, 142, 148, 194, 229
Triiodtironină 133, 146, 175, 187, 189, 192, 279
Triiodtironină liberă (fT3) 175, 203, 205, 207, 208
Triptofan 268, 269
Tromboxan A2 (Tx2) 236
Tropomiozină 103, 104-105

Tropomodulină 107
Troponină C 102, 104, 123
Troponină I 104, 123
Troponină T 104, 116, 123

U

Uree 15, 38-39, 171, 338

V

Valină 36
Valoare cut off 286
Vasoconstricție 158, 267
Vasopresină *vezi* ADH (hormon antidiuretic)
Vitamină A 131
Vitamină C 237
Vitamină D 131
Vitamină E 77, 91, 237
Vitamină K 256
VLDL 36, 46, 50, 53-57, 60-63, 67, 69-73, 89, 91-92, 194

X

Xantomatoză 69-71, 93
Xeroderma pigmentosum (XP) 315-316

Z

Zaharoză 1, 4, 230

