

Le proteine plasmatiche: fisiologia, analitica, elettroforesi e disproteinemie

Vanessa Turinelli, DVM, PhD, diplomata ECVCP, patologo clinico per IDEXX Vet·Med·Lab Italia.

Aspetti fisiologici

Le proteine sono catene polipeptidiche di aminoacidi che costituiscono la componente principale del plasma. Esistono vari tipi di proteine che possono essere pure o combinate con altre sostanze quali colesterolo e trigliceridi per formare le lipoproteine oppure con polisaccaridi per formare le glicoproteine.

Fatta eccezione per le immunoglobuline sintetizzate dalle plasmacellule, la maggior parte delle proteine plasmatiche è prodotta e secreta dagli epatociti. Il controllo della secrezione proteica da parte del fegato è regolato da vari meccanismi, quali pressione oncotica, stati infiammatori o infettivi.

Le proteine svolgono numerose funzioni all'interno dell'organismo, tra le quali le principali sono:

1. costituiscono le fondamenta strutturali delle cellule, tessuti ed organi
2. mantengono la pressione osmotica colloidale (soprattutto albumina)
3. catalizzano numerose reazioni biochimiche
4. fungono da tamponi per mantenere l'equilibrio acido basico
5. garantiscono la coagulazione ematica (fattori della coagulazione)
6. garantiscono la difesa dell'organismo nei confronti dei patogeni (immunoglobuline e fattori del complemento)
7. trasportano metaboliti (albumina e transferrina)
8. regolano il metabolismo cellulare (ormoni)
9. prevengono la proteolisi (α_1 antitripsina)

Le proteine plasmatiche sono basse alla nascita, aumentano con l'assorbimento del colostro e diminuiscono nelle prime 5 settimane di vita quando le proteine colostrali sono state metabolizzate. Progressivamente raggiungono i valori dell'adulto in 6 mesi-1 anno. Nei cuccioli di cane e gatto le proteine plasmatiche hanno fisiologicamente una concentrazione di 1-2 g/dL inferiore rispetto ai valori degli adulti. La concentrazione delle albumine può essere inferiore di 0,5-1 g/dL rispetto ai valori degli adulti ed in condizioni normali. Alla nascita i cuccioli sono tutti ipogammaglobulinemici con piccole quantità di IgG e IgM e senza IgA nel siero (assenti anche IgG nel gatto). Negli animali vecchi le proteine totali sono maggiori perché diminuisce leggermente l'albumina e aumentano le beta e gamma globuline.

Aspetti analitici

Le proteine totali si misurano nel siero e plasma (eparinizzato) con il metodo al **Biureto**, o con il **refrattometro**.

Con il **refrattometro** si può dare una stima delle proteine nel plasma o siero; meglio usare un refrattometro temperato che non risente delle variazioni della temperatura ambientale. È necessario far attenzione alle eventuali interferenze dovute alla presenza nel plasma o siero di elevate concentrazioni di urea, glucosio, Na, Cl, i quali possono far aumentare l'indice di rifrazione. La lipemia macroscopica aumenta l'indice di rifrazione e determina un falso aumento delle proteine totali. L'emolisi e la bilirubinemia (ittero) sembrano non interferire se non eccessivi. È bene ricordare che se si misurano le proteine nel siero si può dare solo una stima della concentrazione proteica totale che risulterà inferiore a quella plasmatica per mancanza del fibrinogeno. Il refrattometro è un metodo meno sensibile ma adeguato per gli esami di routine. Non va bene per le specie aviarie.

Il metodo al **Biureto** è un metodo spettrofotometrico in cui le proteine si legano al tartrato di rame e formano un complesso colorato che può essere misurato. La presenza di emolisi può interferire positivamente con i risultati. Questo metodo è abbastanza accurato per misurare le proteine del sangue ma non è abbastanza sensibile per misurare le proteine del liquido cefalo-rachidiano o di altri liquidi che hanno concentrazioni troppo basse cioè < 10g/L.

L'albumina si può misurare (nel siero) separatamente tramite il metodo spettrofotometrico al **Bromocresolo green** (BCG). L'indicatore BCG si lega alle albumine formando un complesso colorato che può essere misurato e che risulta proporzionale alla concentrazione di albumine nel siero. I risultati non sempre sono affidabili perché possono esserci interferenze: alcune globuline (α_2 macroglobulina) se presenti ad elevate concentrazioni, possono essere erroneamente misurate, così pure la presenza di emoglobina libera può interferire positivamente; i trigliceridi e alcuni anticonvulsivanti e antibiotici invece danno una interferenza negativa. Non è buono per la specie aviaria, per la quale si consiglia l'elettroforesi.

Le globuline si misurano sottraendo il valore dell'albumina da quello delle proteine totali.

Il Fibrinogeno si può misurare in diversi modi:

- **Metodo della precipitazione con il calore:** si misurano le proteine totali tramite refrattometro prima e dopo aver eliminato il fibrinogeno tramite riscaldamento (56–58°C) e centrifugazione. Si tratta di un metodo semiquantitativo che da una stima del valore del fibrinogeno e si usa soprattutto per lo screening dell'iperfibrinogenemia. Non è abbastanza sensibile per individuare una ipofibrinogenemia perché la scala del refrattometro varia di 0,1 g/dL quindi occorre sempre dare un valore approssimativo.
- **Tempo di trombina (TT):** si misura il tempo necessario per la formazione di fibrina dopo aggiunta di trombina al plasma preriscaldato. Maggiore è il tempo, minore è la concentrazione del fibrinogeno nel plasma.
- **Metodo di Clauss:** si tratta di una modificazione del TT in cui il plasma viene diluito a tal punto da rendere minima la concentrazione di fibrinogeno e viene aggiunto un eccesso di trombina in modo da essere sicuri di contrastare gli effetti inibenti la coagulazione da parte dell'eparina e degli FDP (fattori di degradazione del fibrinogeno). Valori noti di fibrinogeno così calcolati sono introdotti in una curva che serve da riferimento per la stima del fibrinogeno di altri campioni (i valori sono trasformati da sec in mg/dL). Questo metodo ci fornisce una misura della concentrazione del fibrinogeno funzionale, molto utile nelle disfibrinogenemie.

Elettroforesi

L'elettroforesi rappresenta il metodo migliore per la separazione analitica delle varie frazioni proteiche. Il siero deve essere preferito al plasma in quanto riduce la difficoltà interpretativa grazie all'assenza del fibrinogeno. L'elettroforesi si può eseguire su acetato di cellulosa, gel di agarosio o di poliaccrilamide a pH 8,4–8,6. Il gel asciugato e colorato viene poi analizzato attraverso un densitometro che produce il classico tracciato elettroforetico e ci fornisce le percentuali. Il metodo che utilizza l'acetato di cellulosa e il colorante Ponceau è più accurato di quello al gel di agarosio. Il principio dell'elettroforesi proteica si basa sulla separazione delle proteine in un campo elettrico in base alle loro caratteristiche di migrazione. Il grado di migrazione verso l'anodo (terminale positivo) è proporzionale alla carica elettrica, alla massa e alla complessità proteica.

Nei mammiferi domestici, l'albumina è quella che migra più velocemente e più lontano perché è piccola e con carica negativa; l' α_2 macroglobulina è grossa ma con carica negativa, per questo migra verso l'anodo; le immunoglobuline restano verso il catodo (terminale negativo) perché hanno carica positiva. Se si usa l'acetato di cellulosa si possono separare 5–9 bande mentre con il gel di agarosio si separano 10–15 bande. Affinché le proteine siano individuate nel tracciato elettroforetico occorre che esse abbiano una concentrazione di almeno 0,1 g/dL. Nel siero di cane, gatto, cavallo con acetato di cellulosa si individuano 5 regioni (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ) mentre nel bovino solo 3 regioni (α , β , γ).

Se si fa l'elettroforesi del plasma allora il fibrinogeno migra nella regione β_2 .

Alterazioni nel gruppo delle α -globuline

In questo gruppo migrano le proteine della fase acuta dell'infiammazione, le HDL, l'afetoproteina. Un incremento di questa frazione si ha generalmente in corso di danno tissutale o infiammazione. A questo gruppo appartengono: α_1 antitripsina, α_1 glicoproteina acida, α_2 macroglobulina, aptoglobina, ceruloplasmina, amiloide sierica A (SAA). L'alterazione di questa frazione avviene rapidamente (24 h nel gatto con FIP) e può essere dovuta anche a cause non infiammatorie, quali: iperadrenocorticismo, diabete mellito, insufficienza renale congenita o acquisita (cane), sindrome nefrotica (aumentano le α_2 macroglobuline e le lipoproteine), malattie epatiche acute o croniche (aumenta α_1 antitripsina, α_1 glicoproteina acida, α_2 macroglobulina, aptoglobina). Una diminuzione si può avere nel cane negli stadi finali di una cirrosi epatica (aptoglobina, α_1 antitripsina, sono indice di prognosi infausta) o in corso di emolisi in vivo o in vitro (perdita di aptoglobina che lega l'emoglobina).

Nell'epatite cronica attiva spesso c'è un ponte α - β .

Alterazioni nel gruppo delle β -globuline

In questo gruppo migrano le proteine della fase acuta dell'infiammazione, le LDL, la transferrina e alcune immunoglobuline. Un aumento di questa frazione spesso segue quello della frazione α in corso di infiammazione o della frazione γ in risposta ad una infiammazione cronica o infezione. Il solo aumento di questa frazione è insolito e può essere dovuto a: sindrome nefrotica (LDL, transferrina), epatite attiva (transferrina, emopessina), dermatite suppurativa (IgM, C3). Occasionalmente ci può essere un picco monoclonale dovuto alla presenza di mieloma multiplo o linfoma. Un picco in questa frazione può essere dovuto anche a emolisi in vitro (emoglobina libera). Una diminuzione di questa frazione è stata rilevata in cani con ipoadrenocorticismo, o iperadrenocorticismo trattato con mitotane.

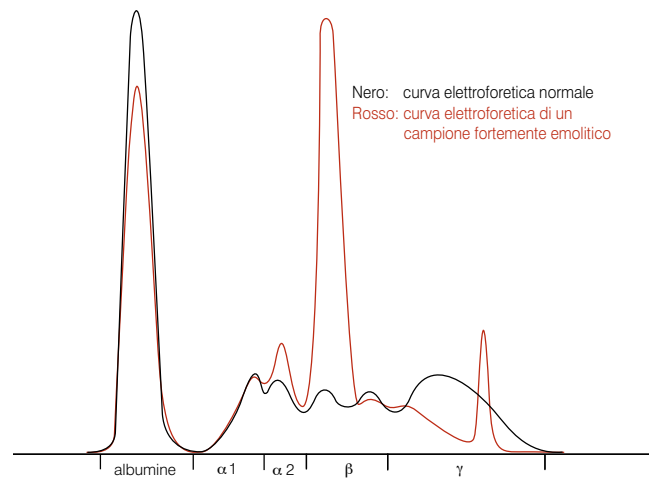
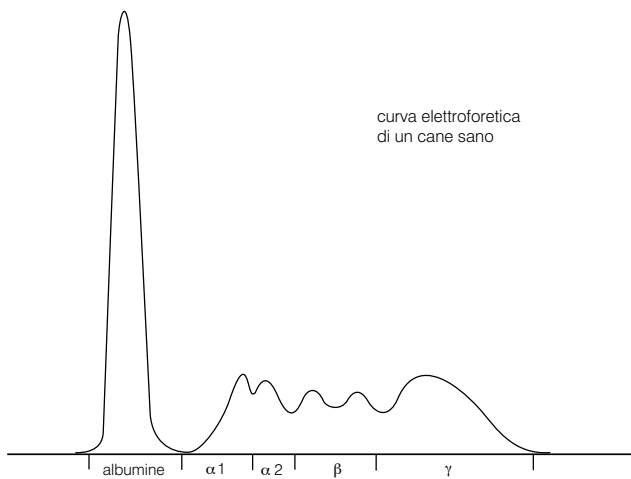
Alterazione nel gruppo delle γ -globuline

In questa frazione migrano le IgG, IgM, IgE, IgA. Molte risposte immunitarie negli animali portano ad un aumento della concentrazione delle immunoglobuline, troppo piccolo per essere rilevato dal tracciato elettroforetico; quando ciò avviene si parla di gammopatie monoclonali o policlonali. Gli aumenti policlonali si hanno in seguito a infezioni severe o croniche (batteri, funghi, virus, rickettsie, parassiti), neoplasie o disordini immuno-mediati. Organismi che tendono a produrre gammopatie policlonali marcate sono: Ehrlichia Canis (si ha spesso un picco β - γ fuso), FIP, Leishmania Infantum, anemia infettiva equina, ma anche epatopatie severe. Negli animali vecchi è possibile vedere un aumento policlonale delle γ -globuline. Le gammopatie monoclonali sono generalmente associate a disordini linfoproliferativi. Picchi biclonali sono stati descritti in un gatto con 2 plasmocitomi distinti nel fegato e in un cane con mieloma multiplo che produceva 2 paraproteine dimero e trimero di IgA. Esistono anche gammopatie monoclonali idiopatiche ma sono rare. L'iperadrenocorticismo può ridurre la frazione delle γ -globuline.

Proteine della fase acuta dell'infiammazione

Esistono proteine dette "positive" perché i loro valori aumentano in corso di infiammazione ma ci sono anche proteine "negative" che invece diminuiscono.

Le proteine positive della fase acuta sono considerate veri e propri markers dell'infiammazione. La concentrazione di queste proteine negli animali sani è irrilevante, per questo sono



usate per diagnosticare l'infiammazione. Il fibrinogeno impiega giorni o settimane per tornare normale dopo la risoluzione dell'evento infiammatorio, mentre la proteina-C reattiva torna ai valori normali rapidamente.

Fanno parte di questo gruppo:

- α_1 antitripsina, α antichimotripsina
- α_1 glicoproteina acida (seromucoide, oromucoide)
- proteina C-reattiva (γ o β)
- α_2 macroglobulina
- ceruloplasmina (α_2)
- aptoglobina (α_2)
- fibrinogeno (β_2)
- amiloide sierica A (α)
- ferritina (β)
- componenti del complemento

Tra le proteine negative della fase acuta dell'infiammazione sono incluse:

- albumina
- transferrina
- α_2 globulina (bovina)

DISPROTEINEMIE

Con questo termine si intende la presenza nel sangue di proteine normali a concentrazioni anormali oppure la presenza di proteine anormali. La disproteinemia può essere selettiva, quando riguarda una sola classe di proteine (per esempio albumina) oppure non selettiva quando interessa tutte le classi proteiche (panipoproteinemia o paniperproteinemia)

Aumento delle proteine totali, cause:

- Deficit relativo di acqua (*emoconcentrazione*): in questo caso le due frazioni, albuminica e globulinica, aumentano approssimativamente della stessa percentuale (*paniperproteinemia*). Ci si aspetta anche eritrocitosi, azotemia prerenale e iperstenuria.
- Aumentata produzione:
 - Infiammazione (infettiva o non infettiva): aumento delle proteine positive della fase acuta dell'infiammazione e delle immunoglobuline.
 - Neoplasia dei linfociti B o delle plasmacellule. *Paraproteinemia*: picco monoclonale di immunoglobuline o di subunità di immunoglobuline dette proteine M (mieloma multiplo, plasmocitoma, linfoma, leucemia linfocitica).

Riduzione delle proteine totali, cause:

- Emodiluizione: eccessiva somministrazione di fluidi IV, insufficienza cardiaca congestizia, cirrosi, sindrome nefrosica, eccessiva secrezione di ADH. Tutte le frazioni risultano modificate nella stessa percentuale (*panipoproteinemia*).
- Eccessiva perdita di proteine. Siccome l'albumina è la proteina più piccola è anche quella che viene persa per prima, per cui inizialmente si può avere una ipoalbuminemia.
 - Perdita di proteine attraverso i reni (glomerulonefriti, sindrome nefrosica, amiloidosi). Basta testare le proteine nelle urine o, meglio ancora, fare il rapporto proteine/creatinina urinaria. In genere l'albumina diminuisce drasticamente mentre le globuline possono diminuire moderatamente o aumentare in corso di glomerulonefrite. Le globuline più grandi non passano attraverso la membrana lesa, quindi l'ipoproteinemia è selettiva. Si avrà dunque albuminuria e all'elettroforesi le α_2 -globuline saranno normali mentre le altre frazioni saranno ridotte.
 - Perdita di proteine attraverso l'intestino. Si ha in associazione a patologie della mucosa dell'intestino tenue o dei vasi linfatici che non riassorbono le proteine contenute nelle secrezioni intestinali e che quindi sono perse con le feci. Nei grossi animali è secondaria a parassitosi intestinali. Nei piccoli animali può presentarsi in corso di linfosarcoma, linfangiectasia, neoplasie istiocitarie, istoplasmosi, atrofia dei villi, colite, enterite eosinofila/linfocitica/plasmocitica o intossicazioni alimentari. Diminuiscono marcatamente sia le albumine che le globuline (queste possono anche essere normali). In genere si ha ipoproteinemia non selettiva ma talvolta può essere selettiva. Se c'è diarrea associata, la diagnosi è facile ma in corso di linfosarcoma, per esempio, può non esserci diarrea e le proteine sono molto basse.
 - Emorragie (*panipoproteinemia non selettiva*): l'ipoproteinemia è dovuta alla perdita ematica e alla diluizione da parte dei liquidi che dallo spazio extravascolare passano a quello intravascolare
 - Perdita di proteine attraverso la pelle. Le bruciate termiche o chimiche fanno essudare le proteine plasmatiche, l'ipoproteinemia può essere mascherata dalla disproteinemia dell'infiammazione. L'ipoproteinemia è non selettiva.
- Diminuita sintesi proteica o aumentato catabolismo
 - Dieta carente di proteine
 - Malassorbimento e maldigestione (insufficienza del pancreas esocrino, disordini intestinali): si ha ipoproteinemia non selettiva con ipoalbuminemia e normoglobulinemia o ipoglobulinemia.

- Insufficienza epatica (cirrosi, necrosi epatica, infiammazione, shunt portosistemico e atrofia epatica, neoplasie). La massa epatica residua e funzionante è < al 20%. Si manifesta in primis con ipoalbuminemia, poi diminuiscono anche le globuline; poiché, talvolta può esserci iperglobulinemia (per aumento soprattutto delle Ig) le globuline possono rimanere invariate. L'ipoproteinemia è non selettiva ma ci può essere un aumento delle frazioni β_2 - o γ (o il ponte gamma-beta). Non è detto che gli enzimi epatici siano aumentati, perché può non esserci un danno cellulare; è consigliabile verificare, però, che non ci sia ipoprotrombinemia.
- Infezioni virali. Nel cavallo ipoglobulinemia con albumine normali si può avere nelle infezioni virali respiratorie.
- Cachessia da malnutrizione, infezioni croniche o neoplasie maligne: si ha ipoproteinemia non selettiva con ipoalbuminemia e normoglobulinemia o ipoglobulinemia.
- Ipoplasia o aplasia linfoide (immunodeficienza genetica del cavallo e del cane, chemioterapia o infezioni che causano deplezione linfoide): L'ipoproteinemia se c'è è minima ed è dovuta a diminuzione delle Ig.

- Mancato trasferimento del colostro: sono diminuite le IgG e le proteine totali. Possono essere mascherate da una eventuale infiammazione.

Iperalbuminemia, cause:

- Emoconcentrazione.
- Terapia con glucocorticoidi: le albumine aumentano nel cane e gatto. Può aumentare anche l'aptoglobina. Può essere dovuta ad un aumento dell'emivita.
- Pseudoiperalbuminemia: se si usa il metodo BCG si può avere interferenza di altre proteine che sono legate dal BCG (orosomucoidi, α_1 glicoproteina acida), soprattutto nel siero di cavallo e suino. L'organismo non produce mai un eccesso di albumine.

Ipoalbuminemia, cause:

- Si ha più comunemente nel cane che nel gatto. Considerata anche come una proteina negativa della fase acuta in quanto rispecchia l'aumento delle globuline (ma diminuisce). Si parla d'ipoalbuminemia vera al di sotto di 16 g/L nei piccoli animali e pony e di 20 g/L nei grossi animali. Le manifestazioni cliniche tipiche sono gli edemi e l'ascite.
- Diminuita sintesi: infiammazione, insufficienza epatica (epatite cronica, cirrosi, tumori epatici, atrofia da shunt porto-sistemico sono le cause più frequenti), malassorbimento-maldigestione (in genere sono associati a enteropatia proteino-disperdente), cachessia (raramente basta da sola a far diminuire le albumine).
 - Aumentata perdita: emorragia, nefropatia proteino-disperdente (amiloidosi e glomerulonefrite sono le più importanti), enteropatia proteino-disperdente (enterite, linfoma, linfangiectasia, emorragie, ulcere, erosioni, intussuscezione, parassitosi quali istoplasma, vermi e pitiosi, sono le cause più comuni), dermatopatia proteino-disperdente.

- Emodiluizione: eccessiva somministrazione di fluidi IV, insufficienza cardiaca congestizia (provoca ascite), cirrosi, sindrome nefrosica, eccessiva secrezione di ADH.

Iperglobulinemia-Ipoglobulinemia

Vedere Iperproteinemia-Ipoproproteinemia.

N.B. per le interpretazioni delle curve elettroforetiche è possibile richiedere una consulenza specifica

