

# Studio qualitativo della proteinuria nel cane

**Ugo Bonfanti DMV**

**Clinica Veterinaria Gran Sasso**

**Via Donatello 26 – 20131 – Milano**

**Andrea Zatelli DMV**

**Ambulatorio Veterinario Associato Miller**

**Via della Costituzione 10 – 42025 – Cavriago (RE)**

Con il termine di proteinuria si definisce la presenza di proteine nelle urine. Occorre a tale proposito ricordare che, anche in condizioni normali, proteine possono essere presenti nelle urine, ma in quantità molto inferiori rispetto a quelle di soggetti ammalati. Nell'uomo, ad esempio, l'eliminazione giornaliera urinaria si aggira intorno ai 150 mg: di questi, il 60/70 % è costituito da proteine di origine plasmatica, ed il 30/40% da proteine di origine renale.

## PROTEINE di origine plasmatica: 60-70%

Albumina (15 mg / 24 ore)

Ceruloplasmina – Alfa 1 glicoproteina acida

Alfa 1 antitripsina – Alfa 1 microproteina

Emopessina – Transferrina – Aptoglobina

Beta 2 microglobulina – RBP – Immunoglobuline

Enzimi

## PROTEINE di origine renale: 30 – 40%

Uromucoide (TH) – Urochinasi – IgA secretorie

Enzimi tubulari

Nel cane viene considerata patologica una proteinuria superiore a 20 mg/kg/die. Il termine “proteinuria” è da preferirsi al termine “albuminuria” poiché in condizioni normali, nel cane e nell’uomo, è possibile riscontrare più di 40 proteine. Le proteine urinarie sono composte da quantità variabili di proteine plasmatiche, di proteine derivanti dall’apparato urinario e, in base al metodo di raccolta, da proteine che derivano dal tratto genitale.

Ancora, la proteinuria si può classificare in fisiologica e patologica. Le proteine di origine patologica possono essere di origine plasmatica (proteine che in condizioni normali non passano la barriera glomerulare), di origine tubulare (presenti qualora il tubulo non svolga più la sua normale attività di riassorbimento), proteine anormali che passano nelle urine e proteine secrete dal rene e dalle vie urinarie.

Con il termine di proteinuria prerenale si intende la perdita di proteine ematiche con l’urina, senza che i reni siano affetti da patologia alcuna. Alcuni esempi comprendono la “overload proteinuria” (in soggetti con grave iperproteinemia), la paraproteinuria (in soggetti con mieloma multiplo o con aumento di immunoglobuline, crioglobuline o macroglobuline nel sangue) e le proteinurie funzionali, senza apparente significato clinico, associate a stress, esercizio fisico, crisi epilettiche, e temporanea congestione venosa dei reni.

Con il termine di proteinuria renale si intende la proteinuria associata ad un danno renale. In particolare: la proteinuria glomerulare si verifica in seguito ad alterazioni della barriera di filtrazione glomerulare (parete dei capillari glomerulari), e prevede in particolare la perdita di albumine; la proteinuria tubulare, conseguente alla perdita della capacità di riassorbimento delle proteine da parte del tubulo prossimale, è caratterizzata dall’escrezione di proteine a basso peso molecolare.

Infine, la proteinuria postrenale prevede la presenza di proteine che derivano da porzioni dell’apparato urogenitale distali rispetto al glomerulo: a seguito di patologie infiammatorie, ischemiche o neoplastiche quali pielonefrite, cistiti, prostatiti, carcinoma uroteliale, ecc.

\*\*\*\*\*

La proteinuria glomerulare prevede una lesione a carico della parete dei capillari glomerulari e la conseguente perdita di proteine di peso molecolare  $> 67000$  Daltons. La proteinuria glomerulare selettiva si verifica in associazione a glomerulopatie di grado lieve o moderato, che consentono il passaggio di proteine plasmatiche con peso molecolare compreso tra  $67000$  e  $80000$  Daltons. Quando la patologia glomerulare peggiora, anche le proteine di peso molecolare maggiore passano attraverso il filtro dei capillari glomerulari (proteinuria non selettiva). In medicina umana vengono adottati degli indici di selettività che consistono nel rapportare la concentrazione di albumina o di transferrina a quella di IgG, e quindi, considerando i rapporti Alb/IgG e Transf/IgG, essi risulteranno tanto più elevati quanto più selettiva sarà la proteinuria.

La proteinuria tubulare prevede invece un danno a carico del tubulo o dell'interstizio; questo si manifesterà in difetto di riassorbimento, o in un'aumentata escrezione di proteine da parte delle cellule del tubulo, o in una saturazione dei meccanismi di riassorbimento delle cellule del tubulo conseguente ad aumentata filtrazione glomerulare. In tal caso le proteine presenti nelle urine avranno peso molecolare  $<$  a  $67000$  Daltons. La proteinuria tubulare può essere completa (coinvolgendo tutte le proteine di peso inferiore a  $67000$  Daltons) o incompleta (comparsa nelle urine di proteine tra  $40000$  e  $67000$  Daltons).

La proteinuria mista rappresenta infine la proteinuria di più frequente riscontro nella pratica clinica. Prevede una perdita di proteine di entità e peso estremamente variabili, ed è correlata a patologie che coinvolgono sia il tubulo che il glomerulo.

\*\*\*\*\*

Le proteine presenti nelle urine sono più difficilmente identificabili e misurabili rispetto a quelle del siero per alcuni motivi. Innanzitutto sono spesso presenti in quantità ridotte e possono inoltre variare molto in termini di qualità e quantità da campione a campione. Possono inoltre essere difficilmente interpretabili poiché, come abbiamo visto, sono in grado di derivare dal plasma, da patologie renali e dall'apparato genitale.

I metodi di determinazione delle proteine urinarie consistono in metodi quantitativi e metodi qualitativi. Essi dovrebbero essere sempre impiegati sul surnatante di urine centrifugate per eliminare le interferenze che potrebbero derivare da globuli rossi, leucociti, cellule epiteliali e cilindri.

La prova colorimetrica con striscia reattiva rappresenta un metodo semiquantitativo che si basa sul viraggio di colore del Blu di Tetrabromofenolo (indicatore) in presenza di proteine: in particolare, i gruppi amminici liberi delle proteine si legano all'indicatore, e la conseguente variazione di colore dipende dal numero di gruppi amminici liberi di ogni proteina. Poiché l'albumina possiede più gruppi amminici rispetto a globuline, emoglobina, proteine di Bence Jones e mucoproteine, i risultati che si ottengono con la striscia reattiva sono considerati semiquantitativi. I risultati non sono influenzati dalla torbidità delle urine; inoltre, risultati falsamente positivi si possono verificare se il pH delle urine è molto alcalino, se le urine sono iperpigmentate, se il campione viene contaminato da composti dell'ammonio quaternario o a seguito di immersione prolungata dello stick nelle urine; reazioni falsamente negative si possono verificare se le urine sono molto diluite, se acidificate e nel caso siano presenti solo globuline, emoglobina o modeste quantità di proteine di Bence Jones.

Gli altri metodi quantitativi sono rappresentati dai metodi turbidimetrici (tra questi, in particolare, quello dell'acido sulfosalicilico), dai metodi basati sul legame proteine – colorante (Blu di Coomassie e Ponceau S) e dai metodi al biuretto.

Inoltre, sempre tra i metodi quantitativi, ricordiamo la determinazione colorimetrica diretta con Pirogallolo Red: in ambiente acido, le proteine modificano lo spettro di assorbimento del complesso pirogallolo red-molibdato; l'intensità di colore che si svilupperà, sarà direttamente proporzionale alla concentrazione di proteine presenti nel campione in esame.

Infine, un cenno particolare merita il rapporto Proteine Urinarie / Creatinina Urinaria (PU/CU). Il rapporto PU/CU misurato in un singolo campione di urine raccolto in qualsiasi momento della giornata, oltre a non venire influenzato dalla concentrazione o dal volume di urine impiegato, si

correla bene con il contenuto di proteine nelle urine nelle 24 ore: un rapporto superiore ad 1 indica un'eccessiva presenza di proteine nelle urine, senza peraltro chiarirne l'origine. Escludendo le cause prerenali e postrenali il rapporto rappresenta un indice importante di danno renale, manifestando quindi elevata specificità; può peraltro essere poco sensibile poiché non è in grado di svelare proteinurie di grado modesto, in particolare quelle di origine tubulare.

\*\*\*\*\*

I metodi qualitativi per lo studio della proteinuria si basano sull'utilizzo della tecnica elettroforetica. In particolare sono state utilizzate l'elettroforesi su acetato di cellulosa, su gel di agarosio, su gel poliacrilamide, su gel poliacrilamide SDS (SDS PAGE), su agarosio SDS Hydragel Proteinuria, nonché l'elettroforesi bidimensionale e l'immunofissazione.

Le urine, raccolte per cistocentesi in modo sterile, possono venire immediatamente processate oppure conservate, mediante l'aggiunta di sodio azide all'1% in quantitativo pari ad 1µl ogni ml di urina, alla temperatura di 4°C per una settimana. Per periodi di conservazione più prolungati si rende necessario il congelamento del campione, ma per un tempo non superiore a 6 mesi.

Le tecniche maggiormente impiegate sono la tecnica elettroforetica su gel di agarosio e quella, sempre in agarosio, ma con pretrattamento del campione con SDS. L'impiego di queste tecniche permette di identificare proteine di peso variabile da 12000 ( $\beta_2$  microglobulina) a 900000 ( $\alpha_2$  macroglobulina ed IgM) Daltons, e di conseguenza di distinguere una proteinuria di origine tubulare da una proteinuria di origine glomerulare.

In particolare l'elettroforesi, che avrà potere risolutivo differente a seconda del supporto e dei sistemi di colorazione usati, fornisce un ampio spettro di informazioni. Occorre inoltre ricordare che con i metodi tradizionali in acetato di cellulosa è spesso necessario ricorrere alla concentrazione del campione con il rischio di modificarne la composizione, perdendo proteine di basso peso molecolare. Inoltre, poiché con l'elettroforesi la migrazione delle proteine avviene sia per massa che per carica, il rischio che si può verificare è quello della mancata individuazione di alcune proteine di basso peso molecolare, talora presenti in quantità ridotta, cui si possono sovrapporre

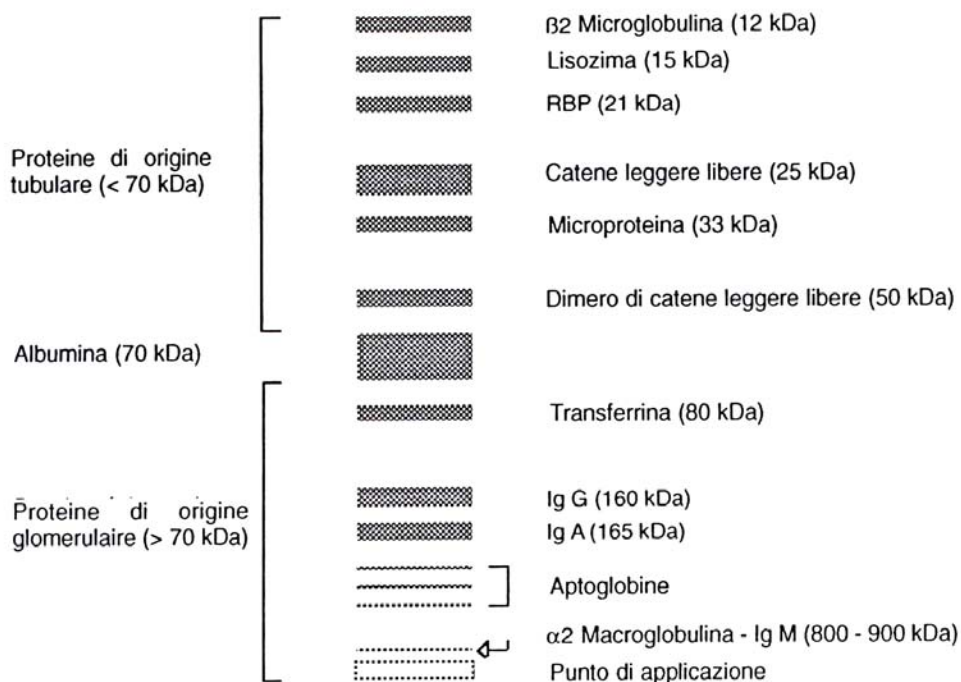
proteine di peso molecolare più elevato. Quindi, l'elettroforesi su acetato di cellulosa permette di inquadrare correttamente le proteinurie glomerulari, ma non fornisce talvolta sufficienti informazioni sulle proteine di origine tubulare.

Altra possibilità viene fornita dall'elettroforesi su gel di agarosio, mediante la quale, grazie anche all'impiego di coloranti specifici, si ottiene un'ottima individuazione delle singole bande proteiche. Il limite di sensibilità della metodica si aggira attorno ai 240 mg/L per ogni singola frazione proteica, anche se la migrazione in gel di agarosio ad alta risoluzione (HR), manifesta una sensibilità di gran lunga maggiore (20 mg/L).

Il metodo attualmente più risolutivo ed applicabile in campo diagnostico è quello che utilizza come supporto il gel di agarosio: in tampone neutro (pH  $7,0 \pm 0,1$ ) SDS, la metodica consente di separare le proteine urinarie secondo il loro peso molecolare (massa), e non per carica, e di distinguere quindi facilmente sul tracciato le proteine di origine tubulare da quelle di origine glomerulare.

In particolare:

**Pattern di migrazione**



In un eccesso di detergente anionico sodio dodecil solfato (SDS), le proteine sono convertite in complessi "proteina - SDS". In tali complessi la conformazione nativa delle proteine è disgregata:

assumono quindi tutte la stessa conformazione e la stessa carica elettrica negativa costante per unità di massa. Quando tali complessi, di forma ellissoidale, con asse maggiore proporzionale alla massa molecolare della proteina, sono processati elettroforeticamente su un supporto (gel di agarosio), le proteine che li compongono si separano in funzione del loro peso molecolare: la migrazione elettroforetica è proporzionale al raggio molecolare effettivo e quindi alla massa della proteina. Sui gel quindi, si possono chiaramente distinguere le proteine di origine tubulare da quelle di origine glomerulare. Il limite di sensibilità per ogni singola frazione proteica è di 15 mg/L. Le caratteristiche metodologiche e la sensibilità del colorante (violetto acido) impiegato per la colorazione dei tracciati, consentono quindi il rilevamento delle proteine senza la preventiva concentrazione delle urine.

Tra le metodiche per lo studio qualitativo della proteinuria, la metodica SDS-PAGE può rappresentare un valido strumento, non invasivo e relativamente economico, che si può impegnare nella diagnosi e nel follow-up terapeutico di pazienti affetti da nefropatie di origine differente.